

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>5</sup> :</b> <b>C07K 5/06, C12N 9/50</b> <b>A61K 37/54, C07K 3/20</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 90/13561</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 15 November 1990 (15.11.90)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/EP90/00647 <b>(22) International Filing Date:</b> 27 April 1990 (27.04.90)  <b>(30) Priority data:</b> 8909836.2                      28 April 1989 (28.04.89)                      GB  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> THE BOOTS COMPANY PLC [GB/GB]; 1 Thane Road West, Nottingham NG2 3AA (GB).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only) :</b> BARRETT, Alan, John [GB/GB]; 8 Stansgate Avenue, Cambridge CB2 2QZ (GB). BUTTLE, David, John [GB/GB]; 5 Hobart Road, Cambridge CB1 3PV (GB). RICH, Daniel, Hulbert [US/US]; 1852 Summit Avenue, Madison, WI 53705 (US).		<b>(74) Agent:</b> THACKER, Michael, Anthony; The Boots Company plc, Patents Department, R4 Pennyfoot Street, Nottingham NG2 3AA (GB).  <b>(81) Designated States:</b> AT, AT (European patent), AU, BB, BE (European patent), BF (OAPI patent), BG, BJ (OAPI patent), BR, CA, CF (OAPI patent), CG (OAPI patent), CH, CH (European patent), CM (OAPI patent), DE, + DE (European patent), DK, DK (European patent), ES, ES (European patent), FI, FR (European patent), GA (OAPI patent), GB, GB (European patent), HU, IT (European patent), JP, KP, KR, LK, LU, LU (European patent), MC, MG, ML (OAPI patent), MR (OAPI patent), MW, NL, NL (European patent), NO, RO, SD, SE, SE (European patent), SN (OAPI patent), SU, TD (OAPI patent), TG (OAPI patent), US.  <b>Published</b> <i>With international search report.          Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
<b>(54) Title:</b> THERAPEUTIC AGENT  <b>(57) Abstract</b> <p>This invention relates to chymopapain, improved pharmaceutical compositions containing chymopapain and to methods of treating damaged, herniated or otherwise abnormal intervertebral mammalian spinal discs which comprise injecting into said discs a solution of the improved composition. The invention further relates to processes for preparing the chymopapain of the invention, to inhibitory peptides and affinity chromatography matrices of use in such processes, and to monospecific antibody preparations raised against chymopapain.</p>		

## ⑫ 公表特許公報(A)

平4-506003

⑬ 公表 平成4年(1992)10月22日

⑭ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

C 12 N 9/50  
A 61 K 37/54  
C 07 K 5/06

Z

7823-4B  
8314-4C  
8318-4H※

(全 29 頁)

⑮ 発明の名称 治療剤

⑯ 特 願 平2-506560

⑰ 出 願 平2(1990)4月27日

⑱ 翻訳文提出日 平3(1991)10月28日

⑲ 国際出願 PCT/EP90/00647

⑳ 国際公開番号 WO90/13561

㉑ 国際公開日 平2(1990)11月15日

優先権主張 ㉒ 1989年4月28日 ㉓ イギリス(GB) ㉔ 8909836.2

⑳ 発 明 者 バレット, アラン ジョン イギリス国シービー 2 キューゼット, ケンブリッジ, スタン  
ゲイト アベニュー 8㉑ 出 願 人 ザ ブーツ カンパニー ビー イギリス国エヌジー 2 3 エーエー ノッティンガム, セー  
エルシー ロード ウェスト 1

㉒ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名

㉓ 指 定 国 AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CA, CF  
(広域特許), CG(広域特許), CH, CH(広域特許), CM(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, DK(広  
域特許), ES, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT  
(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), M  
W, NL, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許),  
TG(広域特許), US

最終頁に続く

浄書(内容に変更なし)  
請 求 の 範 囲

1. 37℃および pH 6.0 において、BAPNA(1mM) に対して800~1700単位/mgの比活性を有し、かつまた「PPIVおよびそれに対する抗体の調製」と題する本明細書の記載に従い得られうるババイア プロテアーゼIV(PPIV)、ババインおよびババイア プロテアーゼIII(PPIII)をそれぞれ、0.2%より少ない量で含有するキモババイン。
2. 37℃および pH 6.0 において、BAPNA(1mM) に対して1000~1700単位/mgの比活性を有する、請求項1に記載のキモババイン。
3. 40℃および pH 6.8 において、BAPNA (2.5 mM) に対して3000~4500単位/mgの比活性を有し、かつまた「PPIVおよびそれに対する抗体の調製」と題する本明細書の記載に従い得られるババイア プロテイナーゼIV(PPIV)、ババインおよびババイア プロテイナーゼIII(PPIII)をそれぞれ0.2%より少ない量で含有するキモババイン。
4. 40℃および pH 6.8 において、BAPNA (2.5 mM) に対して3500~4500単位/mgの比活性を有する請求項3に記載のキモババイン。
5. 1μMまでの濃度のニワトリ シスタチンによって少なくとも95%阻害されるアゾカゼインに対する活性を有する、前記請求項のいずれか一つに記載のキモババ

イン。

6. 少なくとも70%の活性酵素を含有する、前記請求項のいずれか一つに記載のキモババイン。
7. 前記請求項のいずれか一つに記載のキモババインを含有する組成物。
8. 担体をさらに含有する、請求項7に記載の組成物。
9. 脱気したバイアルまたはアンプル中に、無水条件下に密封されている、請求項7または8に記載の組成物。
10. 還元剤をさらに含有する、請求項9に記載の組成物。
11. 可逆性システイン プロティナーゼ インヒビターをさらに含有する、請求項7~10のいずれか一つに記載の組成物。
12. 請求項1~6のいずれか一つに記載のキモババインを含有する医薬組成物。
13. 医薬的に許容される稀釈剤、賦形剤または担体をさらに含有する、請求項12に記載の医薬組成物。
14. 脱気したバイアルまたはアンプル中に、無水条件下に密封されている、請求項12または13に記載の医薬組成物。
15. 医薬的に許容される還元剤をさらに含有する、請求項14に記載の医薬組成物。
16. 非経口投与用の単位投与形態である、請求項12~15のいずれか一つに記載の医薬組成物。
17. ケモタクトレオリシスに使用するための、請求項1~6のいずれか一つに記載のキモババイン。

18. ケモヌクレオリシスに使用するための医薬の製造用の請求項1～6のいずれか一つに記載のキモババイン。

19. 損傷した、ヘルニア様の、またはその他の異常な哺乳動物の脊椎内脊椎盤をケモヌクレオリシスにより処置する方法であって、請求項1～6のいずれか一つに記載のキモババインの医薬的に許容される溶液を、上記脊椎盤の部分を選択的に溶解するのに十分な量で上記脊椎盤中に注入することからなる方法。

20. 哺乳動物対象の異常な脊椎盤を処置する方法であって、

i) 上記脊椎盤中に針を挿入し、

ii) この針の位置をX線によって確認し、

次いで、

iii) 請求項1～6のいずれか一つに記載のキモババインの医薬的に許容される溶液を、上記脊椎盤の部分を選択的に溶解するのに十分な量で、上記脊椎盤中に注入することからなる方法。

21. キモババインの精製方法であって、

a) 可逆性キモババイン阻害性ペプチドがキモババイン分子の活性部位に結合するように、このペプチドのN-末端に、場合によりスパーサーアームを介して共有結合されている支持マトリックスからなる活性部位特定アフィニティクロマトグラフィマトリックスとともに、粗製キモババインの水溶液をインキュベートし、次

v) キモババインを適当な溶出剤で溶出することからなる方法。

24. 酸沈殿を1.2～1.8のpHで行なう、請求項23に記載の方法。

25. 少なくとも1回のカチオン交換クロマトグラフィ工程を組合せる、請求項21～24のいずれか一つに記載の方法。

26. L-Ala-L-PheSc、L-Ala-D-PheSc、L-Phe-D-PheSc、L-Phe-L-PheMo、L-Phe-L-PheOx、L-Tyr-L-PheSc、L-Ala-L-ChaSc および L-Ala-L-LeuSc から選ばれる可逆性キモババイン阻害性ペプチド。

27. L-Ala-L-PheSc、L-Ala-D-PheSc、L-Phe-D-PheSc、L-Phe-L-PheMo、L-Phe-L-PheOx、L-Tyr-L-PheSc、L-Ala-L-ChaSc および L-Ala-L-LeuSc から選ばれるジペプチド。

28. C末端フェニルアラニン誘導体またはフェニルアラニン類縁体誘導体を含有する可逆性キモババイン阻害性ペプチド(ただしこの阻害性ペプチドはL-フェニルアラニル-L-フェニルアラニンセミカルバゾンではないこともある)のN-末端に、場合によりスパーサーアームを介して、共有結合されている支持マトリックスからなる、キモババイン活性部位特定アフィニティクロマトグラフィマトリックス。

いて

b) キモババインを適当な溶出剤により溶出することからなる方法。

22. キモババインの精製方法であって、

1. 粗製キモババインを含有する水性混合物を1.2～1.8のpHで沈殿させ、

2. この混合物から粗製キモババインの水溶液を分離し、次いで、

3. この粗製キモババインの溶液を中和し、次いで場合により脱塩することからなる方法。

23. キモババインの精製方法であって、

i) 粗製キモババインを含有する水性混合物を2.0より小さいpHにおいて沈殿させ、

ii) この混合物から粗製キモババインの水溶液を分離し、

iii) この粗製キモババインの溶液を中和し、次いで場合により、脱塩し、

iv) 可逆性キモババイン阻害性ペプチドがキモババイン分子の活性部位に結合するように、このペプチドのN-末端に、場合によりスパーサーアームを介して共有結合されている支持マトリックスからなる活性部位特定アフィニティクロマトグラフィマトリックスとともに、上記工程(iii)から得られた溶液をインキュベートし、次いで

29. 上記阻害性ペプチドがL-Ala-L-PheSc、L-Ala-D-PheSc、L-Phe-D-PheSc、L-Phe-L-PheMo、L-Phe-L-PheOx、L-Tyr-L-PheSc、L-Ala-L-ChaSc および L-Ala-L-LeuSc から選ばれる、請求項28に記載のキモババイン活性部位特定アフィニティクロマトグラフィマトリックス。

明 細 書

治 療 剤

本発明は、キモババイン、キモババインを含有する改良医薬組成物およびこの改良組成物の溶液を損傷した、ヘルニア様の、またはその他の異常な哺乳動物脊椎内脊椎盤(spinal discs)中に注入することからなる、このような脊椎盤の処置方法に関するものである。本発明はさらにまた、本発明に係るキモババインの製造方法、この方法で使用するペプチドおよびアフィニティ クロマトグラフィ マトリックス、ならびにキモババインに対して生じさせた単一特異性抗体調製物に関するものである。

キモババインはボロー植物[カリカ パパイア (Carica papaya) のラテックス中に存在するシスチンプロテイナーゼである。キモババインには、臨床上の用途、特に「ケモヌクレオリシス」(chemonucleolysis)として知られているプロセスにより、脱出した。またはヘルニア様の脊椎盤の処置または坐骨神経痛の処置に用途が見い出されている [Smith L. による J. Amer. Med. Assoc. 187, 137~140 頁 (1964)]。

キモババインの精製および特徴確認は、Jansen および Balls によって初めて行なわれた [J. Biol. Chem., 137, 405~417 頁 (1941)]。彼等はこの酵素の調製に酸沈殿および塩析の処理を使用した。さら

ア プロテイナーゼ IV から分離することはできない。

アフィニティ クロマトグラフィを使用することに関する刊行物もある。Polgar は、多くの他の技術の中で、アガロース-水銀系カラムにおけるアフィニティ クロマトグラフィを使用するキモババインの精製方法を開示しており [Biochem. Biophys. Acta, 658, 262~269 頁 (1981)]。そしてまた Dubois 等は小規模技術を用いて、カリカ パパイア ラテックスからシスチン プロテイナーゼを分離することを報告している [Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1988), 369, 733~740 頁]。この種のアフィニティ クロマトグラフィでは、不活性マトリックスに結合させた水銀系リガンドとそこにさらされるタンパク質のチオール基との間で相互反応が生じる。すなわち、キモババイン以外のタンパク質、特にバパイア プロテイナーゼ IV のような他のシスチン プロテイナーゼもまた、このようなカラムに結合することができ、引続いてキモババインとともに溶出される。

近年に、化学雑誌に、ヒト カテプシン B (Rich 等による Biochem. J., 235, 731~734 頁, 1986) およびヒストリシン (Luaces および Burrett による Biochem. J., 250, 903~909 頁, 1988) などの特定のプロテイナーゼをエンタモエバヒストリチカ (Entamoeba histolytica) から精製するために、不動化したペプチド誘導体を用いるアフィニティクロマトグ

に近年に、イオン交換クロマトグラフィにもとづく精製方法が使用された。すなわち、たとえば GB

2098997 (Smith Laboratories Inc.) および GB 2156821 (Simmons) には両方ともに、キモババインを他の既知のシスチン プロテイナーゼから分離するために、カチオン交換樹脂を使用することが記載されており、これらの方法は両方ともに、工業的規模でのキモババインの製造に使用されている。しかしながら、生成する物質は、特にカチオン交換クロマトグラフィ工程を組合せた、小規模の多段階法を用いて、Buttle および Barrett によって製造されたキモババイン [Biochem. J., 223, 81~88 頁 (1984)] に比較して、その比活性は比較的低いことが見い出されている。この Buttle らによる生成物は高い比活性を有するが、得られる収率は非常に低く、かつまたこの方法は商業的規模で使用するのには適していない。現在、Buttle らによって、この物質が最近になって単離され、特徴確認されたプロテイナーゼ、バパイア プロテイナーゼ IV によって汚染されており、このバパイア プロテイナーゼ IV はカチオン交換樹脂からキモババインと一緒に溶出されることが見い出された [Biochem. J., 261, 469~476 頁 (1989年7月)]。従って、カチオン交換クロマトグラフィは、バパイア プロテイナーゼ IV 夾雑物を実質的に含有していないキモババインを調製するために使用することができる程度にまで、キモババインをバパイ

ラフィの使用が記載された。この試みは現在、キモババインの精製法には使用されておらず、工業的規模で用いるのに適した、改良されたキモババイン精製方法に対する要求が明らかに残されている。

セリン プロテイナーゼ キモトリプシンのインヒビターである、或る種の合成ペプチド誘導体は、WO 84/00365 に記載されている。

本発明者らはここに、夾雑物、特にバパイア ラテックス中に存在するバパイア プロテイナーゼ IV を含む他のシスチン プロテイナーゼを含有していない。高活性のキモババインを精製、単離するための新規な方法を発見した。

本発明は、実質的に純粋であり、活性形体の当該酵素を高割合で含有するキモババインを提供する。

本発明によるキモババインは、バパイア ラテックス中に見い出される免疫学的に異なるプロテイナーゼ、すなわちババイン、バパイア プロテイナーゼ III (P P III) [これらはともに、Buttle および Barrett により Biochem. J., 223, 81~88 頁 (1984) に記載されている] および特に最近発見されたバパイア プロテイナーゼ IV (P P IV) を実質的に含有していない。従って、本明細書中で使用されているものとして、「実質的に含有していない」の用語は、「実質的に免疫学的に純粋」の用語でも定義することができ、本発明によるキモババインと Buttle 等によって単離され、特徴確認さ

れており (Biochem. J. (1989年7月)、261、469～476頁)、以下に簡単に説明する。純粋 P P I V に対して生じる特異性抗体との間にいかなる実質的な交差反応も存在せず、かつまた Buttle および Barrett により以前に開示された (上記刊行物 (1984))、ババインおよび P P I I I に対して生じる特異性抗体とのいかなる実質的な交差反応も存在していないことを意味する。Buttle および Barrett の方法により製造された、いわゆる「純粋な」キモババインは実質的な量 (約 14%) の P P I V を含有することが見い出されており、そしてまた、これによって固有に生じる抗キモババイン抗体生成物が本発明による精製キモババインおよび精製 P P I V の両方に対して特異性を有することは、特に留意されるべきことである。本発明によるキモババインは、P P I V、P P I I I およびババインをそれぞれ、0.2% より少ない量で、好ましくは多くて 0.1% の量で含有する。

抗原と抗体との間の交差反応は、当技術で周知の慣用の技術によって測定することができる。このような技術には、たとえば、融合ロケット免疫電気泳動法および二重免疫拡散法 (Buttle および Barrett による上記刊行物 (1984) に記載)、単純放射免疫検定法、放射線免疫検定法 (R I A) および酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) が含まれる。

酵素調製物のそれぞれに存在する活性酵素の量は一般

る比活性数値間を直接に比較するには問題がある。正確な数値は、特に正確な条件、たとえば検定に用いられる pH、温度、緩衝剤組成および基質濃度に係る多くの因子に帰因する。Buttle および Barrett によって調製されたキモババイン (上記刊行物 (1984)) は、彼等の論文では、B A P N A に対して、 $2567 \text{ p mol / sec / mg}$  に相当する  $0.154 \text{ } \mu \text{mol / 分 / mg}$  の比活性を有するものとして示されている。しかしながら、Buttle および Barrett により使用されている検定条件は、キモババインの公知医薬指針に用いられている条件とは異なっており、これらの比活性は直接に比較することはできない。

Buttle および Barrett により調製された物質は、従来報告された最高比活性を有するキモババイン調製物であると信じられるので、本発明に係る初期研究は、彼等の論文で特定されている検定条件を用いて行なわれた。本明細書において、この方法を「B A P N A 検定法 No. 2」と記し、この方法から誘導される比活性は、 $40^{\circ}\text{C}$  および pH 6.8 における B A P N A (2.5 mM) に対する比活性の用語で表わし、検定条件がキモババイン医薬製剤に関して用いられている条件とは異なることを明確にする。一つの検定法から得られた結果を、他の検定法から得られた結果に置き換えるために、単純な変換因子を適用することは科学的に正しいことではないが、この検定法を用いて得られる結果は、慣用の医薬級 B A P N A 検定法 No. 1 を用いて得られるものに比較して、2～3 倍高い

に、特定検定条件の下での特定基質に対するその比活性で示される。本明細書で用いるものとして、「B A P N A に対する比活性」の用語は、合成基質 N- $\alpha$ -ベンゾイル-D L-アルギニン p-ニトロアニリド (B A P N A) を用いて、標準検定条件の下で検定した場合における、生成 p-ニトロアニリンのピコモル/秒/生成物の乾燥重量 mg ( $\text{p mol / sec / mg}$ ) で表わされるプロティナーゼ活性を意味するものとする。公知のキモババイン医薬製剤に使用されている標準検定条件は、「B A P N A 検定法 No. 1」または「Smith 検定法」の部分で以下に詳細に説明し、またこれから誘導される比活性は、 $37^{\circ}\text{C}$  および pH 6.0 における B A P N A (1 mM) に対する比活性で表わす。本発明によるキモババインは、 $37^{\circ}\text{C}$  および pH 6.0 において、B A P N A (1 mM) に対して 800～1700 単位/mg、好ましくは 1000～1700 単位/mg、たとえば  $37^{\circ}\text{C}$  および pH 6.0 で評価して、1200～1500 単位/mg の比活性を有するものと定義される。好適態様においては、本発明は  $37^{\circ}\text{C}$  および pH 6.0 において、B A P N A (1 mM) に対して少なくとも 1300 単位/mg の比活性を有するキモババインを提供する。

プロティナーゼ活性は、キモババインおよびその他のシステイン プロティナーゼに関する広大な刊行物全体の中で、合成基質 B A P N A からの p-ニトロアニリンの放出として非常に広く認められているが、示されてい

ことが見い出された。しかしながら、本発明に係る初期研究では、 $40^{\circ}\text{C}$  および pH 6.8 における本発明による純粋キモババインの B A P N A (2.5 mM) に対する比活性は、3000～4500 単位/mg、たとえば 3500～4500 単位/mg であると定義できることが証明された。

その研究が最近公開され (上記刊行物、1989年7月)、以下で簡単に説明するように、本発明の発明者等は、従来技術によって調製されたキモババインの従来未知の夾雑物質、すなわちババイン プロティナーゼ I V (P P I V) を単離し、特徴を確認した。P P I V は B A P N A に対して不活性であるが、アゾカゼインに対してはプロティナーゼ活性を有する。さらにまた、アゾカゼインに対する P P I V 活性は  $1 \text{ } \mu \text{M}$  までの濃度のニワトリ シスタチンによって実質的に阻害されないことが見い出された。本発明によるキモババインのアゾカゼインに対する活性は、この濃度のニワトリ シスタチンによって、少なくとも 95% 阻害される。本明細書で使用するものとして、「アゾカゼインに対する活性」の用語は、以下に記載する標準検定条件の下に、誘導体化タンパク質基質アゾカゼインを用いて検定した場合に、生成される三塩化酢酸可溶性ペプチドの量/時間/生成物の単位乾燥重量による、プロティナーゼ活性を表わす。好ましくは、本発明によるキモババインは、 $1 \text{ } \mu \text{M}$  までの濃度のニワトリ シスタチンによって、少なくとも 97%、さらに特に 98～100% 阻害される、アゾカゼイ

ンに対する活性を有する。

本出願人は、本発明によるキモババインが夾雑タンパク質を含有せず、かつまたこの酵素の活性形を高割合で含有するものとして、初めて調製された実質的に純粋なキモババインであると信じている。この進歩は、そこに夾雑しているタンパク質が、たとえばイオン交換および既知のアフィニティ カラムにおいて、キモババインとともに精製されるという発見の後に、はじめて達成できたものである。引続く研究によって、この夾雑物は P P I V として単離され、特徴確認された。P P I V の調製に使用する方法は、純粋キモババインの調製には適用できないが、P P I V の調製は2つの重要なパラメーターを提供した。これによって、純粋キモババインの特徴が確認できたのである。すなわち、1) P P I V 特異性抗体に対する純粋キモババインの交差反応性は存在せず、そしてまた2) ニワトリ シスタチンの存在下におけるアゾカゼインに対する活性は、純粋キモババインと P P I V とでは相互に異なっている。これら2つの特徴は、キモババインの精製に適する方法の開発にとって必要な基本的道具である。

本発明によるキモババインのほとんど全部の意図する活用分野において、本発明のキモババインが選択されることは容易に明らかなことである。純粋な酵素調製物は、酵素の特徴、たとえばそれらの触媒的特異性および構造に関して、十分に確認しようとする者にとって核心的重

用途、たとえばケモヌクレオリシスにおいて特に重要である。このような処置に対するアレルギー反応が被処置患者の3%余りで生じることがあることが報告されている。粉末状ババイン エキスは食品工業で広く使用されており、ケモヌクレオリシスに対するアレルギー反応の多くは、このような製品による前感作によるものと考えられている。しかしながら、哺乳動物に外来タンパク質抗原を注入すると常に、アナフィラキシー ショックの危険がともなうことも周知である。堅実な医療処置においては、この処置で最適の効果を、かつまたアレルギー反応の危険を最低にするために、このようなタンパク質はいつでも、入手できる最も純粋な、そしてまた最も活性な形態で用いなければならない。

従って、本発明の好適態様により、本発明によるキモババインを含有する医薬組成物が提供される。この組成物は P P I V を実質的に含有していない。このキモババインは、37℃および pH6.0 において、B A P N A (1 mM) に対して 800~1700 単位/mg の比活性を有する。医薬組成物はまた、好ましくは医薬的に許容される無毒性の還元剤、たとえばシステイン遊離塩基またはその酸付加塩、たとえば L-システイン塩酸塩 1 水和物をさらに含有する。一般に、還元剤はキモババイン 4000 単位当たりで約 0.5~3 mg の量で存在させる。この量は、たとえばキモババインの 15~90 重量%に相当する。しかしながら、本発明による医薬組成物はまた、

要性を有する。

従って、本発明のもう一つの態様によって、本発明によるキモババインを含有する組成物が提供される。この組成物は P P I V を実質的に含有していない。

本発明のキモババインは、37℃および pH6.0 において、B A P N A (1 mM) に対して 800~1700 単位/mg の比活性を有する。組成物は、適当な重量の分離した単位形態であることができ、たとえば適量のキモババインが脱気したバイアルまたはアンプル中に、無水条件の下に密封されている形態であることができる。このような組成物は、この酵素の酸化による不活性化を実質的に防止するために、還元剤、たとえばジチオスレイトール、システイン遊離塩基、またはその酸付加塩などをさらに含有することができる。別様には、組成物は、塩の形態で提供される可逆性システイン プロテイナーゼインヒビター、たとえばナトリウム テトラチオネートまたは塩化第二水銀をさらに含有することができる。これらの可逆性インヒビターは、この酵素の活性部位をブロックし、これによって酵素を再活性化する還元剤により置き換えられるまで、酸化によるその不活性化を防止する。その他の慣用の添加剤、たとえば重亜硫酸ナトリウムなどの保存剤、E D T A などのキレート試薬および塩化ナトリウムなどの担体を、所望により添加することができる。

純粋な酵素製剤を使用することはキモババインの臨床

いづれの慣用の医薬的に許容される稀釈剤、賦形剤または担体も含有することができ、たとえば重亜硫酸ナトリウムなどの保存剤、E D T A などのキレート試薬および塩化ナトリウムなどの担体を所望により添加することができる。

本発明によるキモババインを含有する医薬組成物は眼医療、たとえば眼病巣の処置に、あるいは術後組織、たとえば焼痂、潰瘍、圧壊死、とこずれおよびその他の除活力化組織が存在する損傷の壊死組織除去に使用することができる。これらの組成物は一般に、局所施用に適する形態、たとえば傷口に直接に施用できるか、またはこの組成物を含浸した包帯を傷口に適用できるような無菌の溶液、ゲル、懸濁液または軟膏として提供することができる。

好ましくは、本発明によるキモババインは整形外科用途に対して調剤される。このような医薬組成物は通常、非経口投与用の単位投与形態に調剤することができ、たとえば適当な担体中の、または使用前に再構成するのに適した濃縮物形態の無菌の発熱性物質を含有していない溶液または懸濁液の形態に調剤することができる。異常な、または損傷した脊椎内脊髄腔の脊髄中に注入することによって、ここを治療または処置する用途に適した投与単位形態は、本発明によるキモババイン 500~5000 B A P N A 単位 (37℃および pH6.0 において 1 mM の B A P N A 中で検定して) および還元剤、たとえ

ばナトリウム シスチネート塩酸塩を、脱気したバイアル中に充填したものからなることができる。好適投与単位形態は名目上、キモババイン 2000 または 4000 BAPNA 単位 (1mM BAPNA、37℃、pH6.0) を含有する。投与単位形態は広くは、たとえば脱気した容器に充填されており、所望により適当な担体、たとえば塩化ナトリウムと混和されているキモババイン 2~5mg、好ましくは 2.5~3.5mg、およびナトリウムシスチネート塩酸塩 0.2~3mg、好ましくは 1.0~2.0mg からなることができる。

以下に示す実験において、26の血清試料はいずれも、GB209899に記載の方法により製造された市販のキモババイン製剤、Chymodiactin (登録名) に対して、自然獲得 IgE 抗体を有することが見い出された。これらの血清は、本発明によるキモババインに対する IgE 抗体およびババイン ラテックス中に見い出される3種の他のシスチン プロティナーゼ、すなわちパバイン、PP III および PP IV に対する IgE 抗体を含有することも、本発明によって、実験的に証明された。しかしながら、キモババイン、PP III および PP IV に対する平均 IgE レベルは、検出された IgE のほぼ 75% が PP III および PP IV に相当するものであることを示した。これらの結果は、これらのタンパク質が実質的に免疫原性を有し、従来入手できた形態のキモババイン中に含有されている抗原性夾雑物の主要部分を構成しており、

粗製キモババインの水溶液をインキュベートし、次いで

b) 適当な溶出剤によって、キモババインを溶出することからなる。

本発明によるキモババイン精製に、出発材料として使用する粗製キモババインは、新鮮なババイン ラテックスのエキス、市販の噴霧乾燥ラテックス製剤から得られる溶液、ババイン濃縮物または部分的に精製されているキモババインであることができ、あるいは通称「純粋」なキモババインの市販製品の溶液であることができる。しかしながら、ババイン ラテックスのようなババインの比較的完全なエキスは、除去が望まれる他の天然産生成分を非常に実質的な量で含有していることは当業者に認識されている。従って、好ましくは、このような成分の実質的部分を、たとえば濾過または遠心分離による不溶性物質の分離によって除去し、その後で、この精製キモババイン溶液をアフィニティ クロマトグラフィ マトリックスとともにインキュベートする。しかしながら、本発明者によって、酸沈殿工程が特に有利であることが見い出されており、この工程中に、不純物の実質的部分が沈殿する。

ほぼ50年間にわたり、キモババインの精製に使用されてきた酸沈殿法では、粗製キモババインの水溶液のpHをpH2ほどまで低く減少し、放置し、次いでキモババイン溶液を分離する。驚くべきことに、本出願人はここに、この方法に用いられる正確なpHが、生成するキモババイン

驚くほど大きい潜在的抗原性毒を示すことを明白に示している。従って、本発明による医薬組成物は、従来技術の組成物にまさる実質的な利点を有する。

本発明はまた、哺乳動物の損傷した、ヘルニア様の、またはその他の異常な脊椎内脊髄盤を、ケモヌクレオリシスによって処置する方法に関するものであり、この方法は、上記脊髄盤中に、本発明によるキモババインの医薬的に許容される溶液を、この脊髄盤の部分を選択的に溶解するのに充分の量で注入することからなる。

本発明はさらにまた、哺乳動物対象における異常な脊髄盤を処置するもう一つの方法に関するものであり、この方法は、

i) 脊髄盤中に針を装入し、

ii) この針の位置をX線によって確認し、次いで

iii) 本発明によるキモババインの医薬的に許容される溶液を、当該脊髄盤の部分を選択的に溶解するのに充分な量で、この脊髄盤中に注入することからなる。

本発明はまた、キモババインの精製方法に関するものであり、この方法は、

a) 可逆性キモババイン阻害性ペプチドがキモババイン分子の活性部位に結合するように、このペプチドのN-末端に、場合によりスペーサー アームを介して、共有結合している支持マトリックスからなる活性部位特定アフィニティ クロマトグラフィ マトリックスとともに、

ン溶液のPP IV汚染に対して臨界的な影響を及ぼすことを証明した。キモババインの精製における粗製物質の初期工程であると従来考えられてきた、この処理の注意深い追跡および制御によって、PP IVによる汚染が劇的に減少されることがここに見い出された。さらにまた、このPP IVタンパク質が慣用の技術によっては、キモババインと一緒に精製されることも、ここに見い出された。従って、本発明はまた、キモババインの精製方法を提供し、この方法は、

1. 粗製キモババインを含有する水性混合物を、1.2~1.8のpHで沈殿させ、

2. この混合物から精製キモババインの水溶液を分離し、次いで

3. この粗製キモババインの溶液を中和し、そしてまた必要に応じて、塩析することからなる。

好ましくは、この精製工程中に少なくとも1回の、たとえばButtleおよびBarrettにより上記刊行物(1984)に記載されているような慣用のカチオン交換クロマトグラフィを行ない、上記生成物から残留タンパク質夾雑物をいづれも除去する。商品名Mono-SまたはS-Sepharose HP (Pharmacia) として市販されているものなどのカチオン交換樹脂による高速クロマトグラフィ、たとえばFPLC<sup>®</sup>を最終工程として使用すると特に好ましい。

本発明の特に好ましい態様においては、キモババインの精製方法は、

i)粗製キモババインを含有する水性混合物を、2.0より小さいpHで沈殿させ、

ii) この混合物から粗製キモババインの水溶液を分離し、

iii)この粗製キモババイン溶液を中和し、そしてまた必要に応じて、脱塩させ、

iv)可逆性キモババイン阻害性ペプチドがキモババイン分子の活性部位に結合するように、このペプチドのN-末端に、場合によりスパーサーアームを介して、共有結合されている支持マトリックスからなる活性部位特定アフィニティクロマトグラフィマトリックスとともに、工程(iii)から得られる溶液をインキュベートし、次いで

v)適当な溶出剤によって、キモババインを溶出することからなる。

上記の好適なカチオン交換クロマトグラフィ工程は、所望により、上記アフィニティクロマトグラフィの直前に、または後で、別の工程として、または追加の工程として使用できることは当業者にとって明白である。

粗製キモババインを含有する水性混合物は、水または水性緩衝液、たとえばリン酸塩または酢酸塩緩衝液中に懸濁されている、たとえば新鮮なババピアラテックス、噴霧乾燥ババピアラテックスまたはババピア濃縮物

またはキレート形成樹脂、たとえばChelex(Bio-Red、英国)の商品名で販売されているもので除去することにより、活性化させることによって明白に増強することができることはシステインプロテイナーゼ分野で周知のことである。システインプロテイナーゼの活性部位の基本的特徴であることが知られており、そしてまたその活性にとって必須である遊離チオール基の存在が、このような処置によって最適にされる。好ましくは、重金属の除去は、EDTA含有緩衝液に対する透析によって行なう。別法として、カチオン交換クロマトグラフィ工程を使用する場合には、重金属はキモババインを還元剤により活性化させることによって除去することができる。この場合には、重金属はカチオン交換カラムに結合され、引続いてこのカラムから洗出される。

有利には、中和後に得られる粗製キモババイン溶液を還元剤、たとえばシステインで処理し、活性部位の最大露呈を確保し、次いで適当なタンパク質含有量、たとえば30mg/mlまで希釈する。この中和された粗製キモババイン溶液を次いで、活性部位特定アフィニティクロマトグラフィマトリックスと一緒にインキュベートする。これによって、キモババインは、そこに結合されている阻害性ペプチドに、その活性部位を介して特異的に結合される。キモババイン溶液は、たとえば35~40ml/時間/cm<sup>2</sup>の速度で、アフィニティクロマトグラフィマトリックスのカラムに適用することができる。

(たとえば、Powell & Scholefield、英国またはSiebels、米国から市販されている噴霧乾燥ラテックス)からなることができる。好ましくは、この混合物を酸沈殿処理する前に、慣用の方法により、たとえば濾過または濃縮によって、不溶性物質を除去する。この混合物に有機酸または無機酸、好ましくは塩酸などの水性無機酸を徐々に加えることによって、この混合物のpHを、1.0~2.0、好ましくは1.2~1.8、さらに特に約1.5のpHに減少させることにより酸性にすることができる。沈殿した物質は、慣用の方法により、たとえば濾過または遠心分離により除去することができる。生成した酸性粗製キモババイン溶液は、PPIVおよびババインが失われており、かつまたPPIIIが少ない程度にまで失われていることが見いだされた。

この酸性粗製キモババイン溶液は、いずれかの引続くクロマトグラフィ工程に付する前に、この溶液をアルカリ性剤、たとえば水酸化ナトリウム水溶液で中和し、次いで好ましくは、慣用の方法で、たとえばゲル濾過または透析により、この溶液から過剰の塩を除去する必要があることは当業者にとって明白である。さらに別の沈殿した物質はいずれも、濾過または遠心分離により除去することができる。

これらの酵素の活性は、還元剤、たとえばジチオスレイトールまたはシステインにより、あるいは痕跡量の重金属、たとえば水銀をキレート試薬、たとえばEDTA、

アフィニティクロマトグラフィマトリックス1リットルに対し、約1~4gのキモババインを結合させることができる。

アフィニティクロマトグラフィマトリックスは、ゲルまたは膜マトリックスなどの支持マトリックスからなり、阻害性タンパク質はそこに共有結合されていて、この結合によって不動化されている。好適には、この支持マトリックスは、たとえばSepharose(Pharmacia)の商品名で販売されているものなどのアガロースゲルであるが、Zeta(Anachem)の商品名で販売されているもののような誘導体化セルロース系膜物質を使用することもできる。このペプチドのN末端は、直接に、またはスパーサーアーム、たとえばECH Sepharose 4B (Pharmacia)の商品名で販売されている好適ゲルマトリックスによって付与されるような9炭素原子のスパーサーアームを介して結合させることができる。このゲルマトリックスの遊離のカルボキシ基と阻害性ペプチドの遊離アミノ基との間のペプチド結合の生成をもたらすカップリングは、慣用の方法で、たとえば水溶性カルボジイミド、たとえばN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)により助長される酸触媒縮合によって、達成することができる。一般に、カップリングは、ゲルマトリックスと阻害性ペプチドの溶液とを一緒に、EDCの存在の下に、たとえば室温で24時間、おだやかに攪拌することによって達成され



る。ゲルマトリックスに対するペプチドの適当なカップリング割合は、たとえばペプチド3〜4g/ゲル1リットルである。

このアフィニティクロマトグラフィマトリックスは、使用前にカラムに前充填することができる。しかしながら、使用されるクロマトグラフィマトリックスがゲルマトリックスである場合には、バッチ式インキュベーション工程を利用することもでき、次いで所望により、このマトリックスをカラムに充填し、引続いて酵素の溶出を行なうこともできる。好適には、このマトリックスを使用する前に、水性緩衝液で十分に洗浄し、痕跡量の未結合ペプチドおよび縮合触媒を除去する。製造に使用する場合には、アフィニティクロマトグラフィマトリックスのカラムは、好ましくはその場での洗浄、たとえば水性エタノールによる洗浄に対して耐性であるべきであり、この場合には、このカラムは再使用することができる。

可逆性キモバイン阻害性ペプチドは、支持マトリックス上に不働化されている場合には、粗製キモバイン調製物中に見い出される他のシステインプロテナーゼ、特にPPIVの活性部位に結合することができるが、引続いてそこから分離することができるペプチドである。好適な阻害性ペプチドのグループの中で、C末端アミノ酸はアルデヒド誘導体、たとえばセミカルバゾン、メトキシイミンまたはフェニルアラニンもしくはフェニルア

ラニン類縁体のオキシムを包含する。さらに特に、C末端アミノ酸は、フェニルアラニン誘導体、たとえばD-またはL-フェニルアラニンセミカルバゾン(PheSc)、メトキシイミン(PheMo)またはオキシム(PheOx)、あるいはフェニルアラニン類縁体の誘導体、たとえばD-またはL-アラニンセミカルバゾン(AlaSc)、D-またはL-シクロヘキシルアラニンセミカルバゾン

(ChaSc)、あるいはD-またはL-ロイシンセミカルバゾン(LeuSc)であることができる。下記のC末端ジペプチド類は有利なキモバイン阻害性ペプチドであることが見い出された、すなわち：L-Ala-L-PheSc、L-Ala-D-PheSc、L-Phe-D-PheSc、L-Phe-L-PheSc、L-Phe-L-PheMo、L-Phe-L-PheOx、L-Tyr-L-PheSc、L-Ala-L-ChaScおよびL-Ala-L-LeuSc。ジペプチドL-Phe-L-PheScは、LuacesおよびBarrettにより開示されている(250、903〜909頁、1980)。特に好適なペプチドはジペプチド類、特にL-Ala-L-PheSc、L-Ala-D-PheScおよびL-Phe-D-PheScである。これらの新規な阻害性ペプチドそれ自体およびこれらのペプチドを含有する新規なアフィニティクロマトグラフィマトリックスは、本発明のもう一つの態様を構成する。

このアフィニティクロマトグラフィマトリックスからキモバインを溶出するのに先立ち、このマトリッ

クスは、たとえばpH4〜5のクエン酸塩または酢酸塩緩衝液のような水性緩衝液で洗浄し、非特異的結合物質を除去することが望ましい。この洗浄用緩衝液およびまた溶出用緩衝液には、疎水性相互反応およびマトリックスと粗製キモバイン成分との間の他の非特異的結合反応を減少させる試薬を添加すると、特に有利であることが見い出された。このような試薬は、たとえばEDTA、イソプロパノールおよびエタジオールを包含する。

キモバインは次いで、このマトリックスから適当な溶出剤を用いて溶出する。適当な溶出剤は、阻害性ペプチドに対する活性部位の親和性を減じることによって、あるいはペプチドを活性部位から選択的に位置変更することによって、不働化阻害性ペプチドとそこに結合しているキモバインとの間の結合を分断する。阻害性ペプチドに対するキモバインの親和性は、たとえばその活性部位の特性をイソプロパノールのような変性剤により、またはキモバインの活性pH範囲以上または以下のpHを有する溶出剤により、減少させることができる。しかしながら、このような溶出剤は、溶出された酵素の不可逆的不活性化が生じないようなものでなければならないことは当業者にとって明白である。別法として、キモバインは、阻害性ペプチドに堅く結合する成分、たとえば別種のシステインプロテナーゼを過剰量で含有する溶出剤によって選択的に転置させることもできる。

しかしながら、本発明の好適態様においては、溶出剤

は、キモバインの活性部位に競合的に結合する可逆性システインプロテナーゼインヒビターを含有しており、これによって、キモバインを不働化阻害性ペプチドから転置させる。慣用のインヒビターには、たとえば低分子量ジスルフィド類、たとえば2, 2'-ジビリジルジスルフィド、ヒドロキシエチルジスルフィド、メチル-2-ビリジルジスルフィドおよびナトリウムテトラチオネート、ならびに水銀系試薬、たとえば塩化第二水銀、p-クロロマーキュリベンゾエートおよびメルサリルが包含される。キモバインと不働化阻害性ペプチドとの間の親和性が、使用される特定のペプチド、溶出剤緩衝液のpH、イオン強度および組成、ならびに使用される温度によって異なることは当業者にとって明白である。従って、キモバインの溶出に要求されるプロテイナーゼインヒビターの正確な性質および濃度はまた、変えられる。さらにまた、水銀系試薬は一般に、ジスルフィド試薬よりも迅速に、結合キモバインと平衡になるので、このようなインヒビターを用いると、連続溶出を使用することができる。結合キモバインとゆっくりだけにだけ平衡になるインヒビターは、キモバインの溶出に先立ち、たとえば1〜2時間またはそれ以上の時間にわたり、マトリックスをインヒビターとともにインキュベートする必要があることがある。しかしながら、溶出フラクションのタンパク質含有量およびプロテナーゼ活性は慣用の方法で追跡することができ、そしてまた溶

出剤のイオン強度または種類およびマトリックスとインヒビターとのインキュベーション時間は、キモババインをマトリックスから効果的に、かつまた選択的に転置するために変えることができる。少ない量のタンパク質を含有するか、または少ない量のキモババイン活性を有する溶出フラクションは次いで、廃棄することができる。

好ましくは、溶出剤のpHは、キモババインと阻害性ペプチドとの間の相互反応を弱めるのに十分に低く、たとえばpH4～5、さらに特にpH4.5である。適当な溶出剤には、たとえばクエン酸ナトリウム(50 mM)およびEDTA(1 mM)を含有する水性エタノール(33%)中のヒドロキシエチルジスルフィド(100 mM)、pH4.5; クエン酸ナトリウム(50 mM)およびEDTA(1 mM)を含有する水性エタノール(33%)中のメチルピリジジスルフィド(30 mM)、pH4.5; 水酸化ナトリウム(50 mM)およびEDTA(25 mM)を含有し、酢酸でpH4.5に調整されている水性エタノール(33%)中のメルサリル酸(10 mM)および酢酸ナトリウム(50 mM)を含有する水性エタノール中の塩化第二水銀(10 mM)、pH4.5が含まれることが見出された。塩化第二水銀は特に好適な可逆性システインプロテイナーゼインヒビターである。

本発明による好適方法におけるアフィニティクロマトグラフィ工程は、BAPNAに対する活性に関して測定して、あるいはE-64またはヨード酢酸による活性

する。採取された精製キモババインは好ましくは、たとえば冷凍乾燥によって凍結乾燥させた後に、貯蔵する。

本発明によるキモババインの特徴は、当業者に知られている方法によって確認することができる。このような方法には、たとえばN-末端アミノ酸分析、E-64またはヨード酢酸による活性部位滴定およびその場合の不活性化率、ドデシル硫酸ナトリウムまたはマルチゾナルカソダルポリアクリルアミドゲル電気泳動および異なるプロテイナーゼ基質に対する活性が含まれる。

本発明による新規な阻害性ペプチドは、当技術で既知の方法と同様の方法で調製することができる。一例として、ジペプチド誘導体は、以下の一連の工程で合成することができる：

a) 阻害性ペプチドのC末端を形成するためのアミノ酸(第一アミノ酸)のC末端は、たとえばイソブチルクロロホーマートおよびN-メチルモルホリンの存在の下に、O、N-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩とを反応させ、ジメチルヒドロキシアミド誘導体を生成させることにより、保護することができる。好ましくは、この第一アミノ酸のN-末端を初めに、たとえば三級ブトキシカルボニルで保護する。

b) この保護された第一アミノ酸、たとえばジメチルヒドロキシアミド誘導体を次いで、強酸、たとえば三フッ化酢酸と反応させ、四級アンモニウム塩を生成させる。

c) この保護された第一アミノ酸の四級アンモニウム塩

部位滴定によって、この方法により精製されたキモババインの比活性を明白に増加させる。活性形態のキモババインは、好んで結合され、そしてまた溶出され、従って、粗製物中に存在する不活性形態のキモババインおよびいくつかの他のシステインプロテイナーゼとは異なっている。アフィニティクロマトグラフィによって精製された、本発明による新しく調製したキモババインは一般に、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに特に少なくとも90%の活性酵素を含有する。

一般に、精製キモババインは、溶出液から採取し、その後で貯蔵するか、または使用する。好ましくは、この酵素の活性部位からシステインプロテイナーゼインヒビターを転置させるために、溶出されたキモババインはさらに精製する。インヒビターは、システインなどの還元剤の過剰量を添加することによって転置させ、所望によって、任意に慣用の技術、たとえばゲル濾過または透析を用いて、この転置されたインヒビターを分離する。別法として、インヒビターはまた、特殊な樹脂上への吸着によって分離することができ、たとえば低分子量ジスルフィド類はグルタチオンアフィニティカラムに吸着させることができ、そしてまた水銀系試薬はキレート形成樹脂に吸着させることができる。好適には、インヒビターは、この酵素をカチオン交換カラムに結合させたまま、還元剤、たとえばシステインで活性化し、引続いてインヒビターをカラムから洗出することによって分離

を次いで、第二アミノ酸誘導体、たとえばN-カルボベンゾキシ誘導体と反応させ、ジペプチド誘導体を生成させることができる。

d) 上記で生成されたジペプチド誘導体を温和な還元剤、たとえば水素化ジイソブチルアルミニウムまたは水素化リチウムアルミニウムで還元し、このジペプチドのC-末端部に遊離のアルデヒド基を生成させることができる。

e) 上記で生成されたアルデヒドを、たとえばセミカルバゾンとの反応によりセミカルバゾンに、メトキシアミン塩酸塩との反応によりメトキシイミンに、あるいはヒドロキシルアミンとの反応によりオキシムに、誘導体化させることができる。

f) 最後に、この保護されたN-末端を脱保護することができ、たとえばN-カルボベンゾキシ基は木炭上10%パラジウムを使用する接触還元により分離することができる。

#### 分析方法の説明

##### タンパク質測定

可能な場合には、ババピアラテックス調製物に関しては $A_{280}$ 、1% = 20.0を用いる $A_{280}$ によって、およびまた精製または部分精製キモババイン調製物に関しては $A_{280}$ 、1% = 18.3を用いる $A_{280}$ によって測定した(Robinson、1975、Biochemistry、14、3695～3700)。或る種のチオール含有試薬およびジスルフィド化合物は280 nmで吸光する傾向を有す

る。これらが存在する場合には、Bio-Rad 染料結合検定法(Bio-Rad Laboratories、英国)を使用してタンパク質濃度を測定した。濾過し、噴霧乾燥したババイアラテックス溶液( $A_{280}$ 、1% = 20.0)を標準として使用した。この方法は $A_{280}$ におけるよりもプロトンの干渉が小さい。精製酵素調製物中のタンパク質は、この生成物の総乾燥重量によって推定した。

#### キモババイン活性の測定

##### a) BAPNA に対する活性 (検定法 No. 1) - Smith 検定法

試料をそれぞれ、EDTA (1 mM) およびシステイン塩酸塩 1 水和物 (10 mM) を含有する水性リン酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M)、pH6.0 である「緩衝液 1」に、1.0 ml の最終容積にまで加えた。酵素 (試料中に存在する場合) を 37°C で 5 分間活性化させた後に、予め 37°C に加熱されている N- $\alpha$ -ベンゾイル-DL-アルギニン p-ニトロアニリド (BAPNA) (1.25 mM) 基質溶液の添加により反応を開始させた。

註) 基質溶液は、BAPNA 30.0 mg を温かいジメチルスルホキシド中に溶解し、37°C に予備加熱されている緩衝液 1 45.0 ml に、この溶液をゆっくり加え、次いで追加の緩衝液 1 によって 50.0 ml にすることによって調製した。この基質溶液は 30°C 以上に保持し、BAPNA の沈殿を防止した。

37°C におけるインキュベーションを 30 分間続け、

緩衝液 1 ml の添加により、反応を停止させた。放出された 4-ニトロアニリンを、 $\Delta A_{410}$  の測定によって決定した。これらの条件の下で、活性 1 単位は、4-ニトロアニリン 1 ピコモル/秒 ( $\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) の放出に相当する。

これらの検定条件は、Buttle および Barrett により記載され (上記刊行物、1984)、例 21、23 および 26 に記載の初期実験で使用されている条件に正確に相当する。

BAPNA 検定法 No. 1 と No. 2 とを用いて得られたキモババイン活性に係る絶対値は相互に異なっており、方法 No. 2 で得られる数値は方法 No. 1 を用いて得られる数値よりも約 2~3 倍高い。

##### c) ヨード酢酸を用いる活性部位滴定

ヨード酢酸を用いるキモババインの活性部位滴定は、Zucker 等により Biochim. Biophys. Acta 828、(1985)、196~204 頁に記載されている E-64 を用いる活性部位滴定と同様の方法で行なった。キモババイン溶液を上記 a) に記載されているとおりに、緩衝液 1 中に希釈し、タンパク質 60  $\mu\text{M}$  ( $A_{280}$ 、1% = 18.3、Robinson の上記刊行物 (1975) から計算して、 $\epsilon_{280} = 4.3284 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  およびまた Jacquet らのアミノ酸配列 (Biol. Chem. Hopper-Seyler、370、425~434 頁、1989 年 5 月) から計算して MW = 23656) を含有する溶液を生成させた。

次いで酢酸 (4 N) 1 ml の添加により反応を止めた。放出された 4-ニトロアニリンを、 $\Delta A_{410}$  の測定により決定した。活性 1 単位は、これらの条件の下での 4-ニトロアニリン 1 ピコモル ( $\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) / 秒の放出に相当する。

これらの検定条件は、Smith Laboratories Inc. の名前で出願された GB 2098997 中で用いられている条件に相当し、世界中で販売されているキモババインの医薬製剤、たとえば Boots Company PLC、英国により Chymodiactin の商品名で販売されているキモババインおよび Sinpoong、韓国により Disken の商品名で販売されているキモババインの検定に使用されている。これらの活性単位は国際的に認められており、一般に「Smith BAPNA 検定単位」として用いられている。

##### b) BAPNA に対する活性 (検定法 No. 2)

試料をそれぞれ、EDTA (1 mM) およびジチオスレイトール (2 mM) またはシステイン (4 mM) を含有する水性リン酸ナトリウム緩衝液 (0.10 M)、pH6.8 に、0.975 ml の最終容積まで加えた。酵素 (試料中に存在する場合) を 40°C で 5 分間活性化させた後に、ジメチルスルホキシド中の N- $\alpha$ -ベンゾイル-DL-アルギニン p-ニトロアニリド (BAPNA) (100 mM) 25  $\mu\text{l}$  の添加により、反応を開始させた。インキュベーションを 40°C で 10 分間続け、次いで水性塩化酢酸ナトリウム (0.10 M) / 酢酸ナトリウム (0.20 M)

このキモババイン溶液の各 20  $\mu\text{l}$  を滴定管に入れ、緩衝液 1 20  $\mu\text{l}$  (対照では 40  $\mu\text{l}$ ) とともに、37°C で 5 分間インキュベートした。各滴定管に、ヨード酢酸水溶液 (それぞれ、10、20、30、40、50 および 60  $\mu\text{M}$ ) 20  $\mu\text{l}$  を加え、この混合物を 37°C で 10~20 分間、予備インキュベートした。上記 a) に記載の BAPNA 基質溶液 4 ml を 37°C に予備加熱して加えることによって、反応を開始させた。インキュベーションを 37°C で続け、30 分後に、上記 a) に記載のとおりにして反応を停止し、次いで放出された 4-ニトロアニリンを  $\Delta A_{410}$  によって測定した。このようにして得られた活性キモババインのモル濃度を  $4.3284 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  のキモババインに関するモル吸光係数にもとづいて、タンパク質モル濃度と比較した。活性タンパク質の量は次いで、総タンパク質に対するパーセンテージとして表わした。

##### d) アゾカゼインに対する活性

アゾカゼインに対する活性は、Rowan 等により Arch. Biochem. Biophys. 267、262~270 頁 (1988) に以前に開示された方法により、1  $\mu\text{M}$  より少ない酵素 (分子量 24,000 にもとづく) および所望により、ニワトリ シスタチン 1  $\mu\text{M}$  を用いて測定した。酵素およびインヒビターの濃度はいづれも、活性分子の濃度を表わす。

単純放射免疫拡散法による免疫学的検定

単純放射免疫拡散法は、以下に示すMancini等の方法 (Immunochem 2、235~254頁、1965) にもとづいている。NaCl (0.14 M) を含有する水性リン酸ナトリウム (10 mM)、pH7.3 中に入れた、単一特異性 IgG 製剤含有アガロース (9% w/v) を Gel Bond® (FMC Corporation、Maine、米国) 上に注ぎ入れ、1.5 cm 離して四角形の凹部 ( $r=1\text{ mm}$ ) に切り取った。対照試料および未知試料をこれらの凹部の中で無作為に分布させ、周縁現象による誤りを最小にした。これらの凹部に抗原を加えた後に、プレートを24時間放置し、沈殿環を発現させた。これらを次いで、洗浄し、乾燥させ、次いで放置した。標準曲線を作成するためには、純粋で、温和なカルボキシメチル化抗原を使用した。この曲線は抗原対環直径の二乗として作成した。有効検定範囲は抗原25~300 ng/凹部であった。

PPIV および PPIV に対する抗体の調製

#### a) アフィニティ カラムの調製

ジメチルホルムアミド (20 ml) 中の  $\alpha\text{-NH}_2\text{CH}_2\text{CN} \cdot \text{HCl}$  (20 ミリモル) およびジイソプロピルエチルアミン (20 ミリモル) の攪拌した混合物に、プテロオキシカルボニル-L-Phe-p-ニトロフェニル エステル (10 ミリモル) を加えた。この混合物を20℃で2時間攪拌し、次いで酢酸エチル (100 ml) で希釈し、水 (2回)、水性トリエチルアミン (5回)、水 (3回)、水性重硫酸カリウム (2回)、水 (3回) で洗浄し、乾

燥させ、次いで蒸発させた。残留物を酢酸エチル/ヘキサンから結晶化させ、Boc-L-Phe-NHCH<sub>2</sub>CN、融点: 134.5~135℃を得た。

ジクロロメタン (10 ml) 中の Boc-L-Phe-NHCH<sub>2</sub>CN の溶液 (5 ミリモル) に、氷冷水性三フッ化酢酸 (10 ml) を加えた。この反応混合物を20℃で30分間インキュベートし、次いで40℃で蒸発させることにより、溶媒を除去した。この残留物をクロロホルムに溶解し、蒸発させ、次いでこの処理を2回以上繰返した。生成した粗製三フッ化酢酸をジメチルホルムアミド (10 ml) 中のジイソプロピルエチルアミン (7.5 ミリモル) の溶液中に溶解し、次いで Boc-Gly-p-ニトロフェニル エステル (6.25 ミリモル) および N-ヒドロキシベンゾトリアゾール 1 水和物 (6.25 ミリモル) を加えた。次いで、p-ニトロフェノールを発生させる (金色) に十分なジイソプロピルエチルアミンを滴下して加え、この混合物を室温で2時間攪拌した。N,N-ジエチルエチレンジアミン (1.5 ml) を加え、15分後に、酢酸エチル (60 ml) を加え、この混合物を水、水性トリエチルアミン、水、水性重硫酸ナトリウム、水で洗浄し、乾燥させ、次いで蒸発させた。この残留物をシリカ上でクロマトグラフィ処理し、酢酸エチル/ヘキサン (20/1) で溶出し、Boc-Gly-L-Phe-NHCH<sub>2</sub>CN を泡状物の形態で生成した。

Boc-Gly-L-Phe-NHCH<sub>2</sub>CN (30 mg) を三フッ

化酢酸: ジクロロメタン: アニソール (25:65:10、1 ml) 中に溶解し、0℃で30分間インキュベートした。この混合物を、34℃で回転蒸発器により乾燥させ、この残留物を次いでメタノール (1.5 ml) および水性NaHCO<sub>3</sub> (0.1 M、pH8.0、1.5 ml) 中に溶解し、リガンド溶液を得た。

活性化CH-Sepharose® 4B (Pharmacia、3 g 乾燥重量) を塩酸水溶液 (1 mM、75 ml) 中で4℃において一夜にわたり水和させ、次いで塩酸 (1 mM、600 ml) で、引続いて水性NaHCO<sub>3</sub> (0.1 M、pH8.0、300 ml) により洗浄した。このゲルを水性NaHCO<sub>3</sub> (0.1 M、pH8.0、30 ml) 中に懸濁し、リガンド溶液 (上記) を加え、この混合物を20℃で一夜にわたり、おだやかに攪拌した。このゲルを焼結ガラス フィルター上に採取し、水性メタノール (50% v/v、180 ml) で、次いで水 (180 ml) で洗浄し、次いで塩酸でpH9.0に調整した水性エタノールアミン (0.1 M、30 ml) 中に懸濁した。この懸濁液を20℃で4時間振りまぜ、次いでゲル状物を採取し、水 (500 ml) で洗浄し、「施用」緩衝液<sup>2</sup> (リン酸ナトリウム (50 mM)、EDTA (1 mM)、エタジオール (33%)、pH6.8) 中で4℃において保存した。

#### b) PPIV の精製

Sepharose® -Ahx-Gly-L-Phe-NHCH<sub>2</sub>CN のカラム (床容積4 ml) を「溶出用」緩衝液 (クエン酸ナト

リウム (50 mM)、エタジオール (33%)、pH4.5、12 ml) で洗浄し、次いで「施用」緩衝液 (上記参照、12 ml) で洗浄した。

噴霧乾燥バパイア ラテックス (0.5 g) を施用緩衝液 (10 ml) 中に溶解し、次いで濾過した (0.22 μm 孔)。この濾液のタンパク質濃度を、Bio-Rad 染料-結合検定法 (Bio-Rad Laboratories、英国) を用いて測定した。この混合物に、ジチオールスレイトールを2 mMの最終濃度にまで加え、この混合物を0℃で20分間、インキュベートした。ラテックス タンパク質 80 mg を20℃でカラムに適用し (38 ml/時/cm<sup>2</sup>)、引続いて施用緩衝液 (8 ml) を、次いで溶出用緩衝液 (8 ml) を適用した。ヒドロキシエチルジスルフィド (50 mM) を含有する溶出用緩衝液 (4 ml) を次いで適用し、流れを止め、カラムを20℃で一夜にわたり放置した。溶出用緩衝液を含有するヒドロキシエチルジスルフィドによる溶出を再開し (10 ml)、溶出フラクション (1 ml) を採取した。BAPNA に対して活性を示すフラクションを集め、EDTA (1 mM) を含有する水性酢酸ナトリウム/酢酸 (50 mM) で予め平衡した Mono S HR 5/5<sup>+</sup> (カチオン交換) カラムに直接に適用し、次いでこのカラムを、A<sub>280</sub> nm がゼロに戻るまで、同一緩衝液で洗浄した (1 ml/分)。このカラムに酢酸ナトリウム 1 M までの勾配 (21.5 mM Na<sup>+</sup>/ml) で適用し (bottle および Barrett、上記刊行物、1984)、フラクション

(1 ml) を採取した。2つの主要タンパク質ピークが溶出された。約0.17 M Na<sup>+</sup> で溶出する第一のピークはババインに相当し、そして約0.38 M Na<sup>+</sup> で溶出する第二のピークはPPIVに相当する。このPPIVピークフラクションを集め、水性EDTA (1 mM) に対して透析し、凍結乾燥させ、次いで-20℃で保存した。純粋なPPIVはBAPNAに対して検出可能な活性を有していないが、1 μMの濃度のニワトリシスタチンにより阻害されない、アゾカゼイン-消化活性を伴う。

#### c) PPIV特異性抗体の調製

使用前に、純粋なPPIV抗原を、Zucker等により Biochim. Biophys. Acta, 828, 196~204頁 (1985) に記載された方法により、温和にカルボキシメチル化させた。このPPIVに対する抗血清を次いで、ウサギに発生させた。この発生は、フロインズの完全アジュバント中のこのカルボキシメチル化タンパク質360 μgを筋肉内注射し、2週間後に、完全アジュバント中の100 μgを皮下注射することによって行なう。IgGは、Heide およびSchwick によってHand book of Experimental Immunology (Weir, D.M. 編)、1巻、7.1~7.11、Blackwell、Oxfordに記載されておりに硫酸アンモニウム分別によって、引続いてNaCl (0.14 M) 含有水性リン酸ナトリウム (10 mM)、pH 7.3中に透析することによって、抗血清から部分的に精製した。

rose HP、Tween、Zeta およびZataffinity はいずれも商品名である。

工程はいづれも、別段の記載がないかぎり、室温で行なった。

#### 例 1

##### L-アラニル-L-フェニルアラニル セミカルバゾン 段階 a

A) O, N-ジメチルヒドロキシルアミンHCl (10.23 g) を乾燥N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) (100 ml) へ室温でかきまぜながら加えた。温度を30℃以下に保ちながら、N-メチルモルホリン (10.6 g) を5分間にわたり加えた。白色沈殿が生じ、混合物を0℃に冷却した。

B) N-t-Boc-L-Phe (26.5 g) を乾燥テトラヒドロフラン (THF) (200 ml) に溶かし、-10℃に冷却した。この溶液に、温度を-10℃に保ちつつトリブチルクロロホルメート (14.38 g) を5分間にわたり加えた。温度を-10℃に保ちながらN-メチルモルホリン (10.6 g) を10分間にわたり加え、かきまぜを更に10分間続けた。

C) 懸濁液Aを懸濁液Bへ-10℃で15分間にわたり加えた。混合物を室温まで温め、次に3時間かきまぜた。次に、生じた混合物を0℃に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン (10.2 g) を5分間にわたり加えた。水 (200 ml) および酢酸エチル (200 ml) を加え、

このPPIV特異性IgG調製物を使用し、前記の単純放射免疫拡散法によって、PPIVを検定した。

以下の例は、例によって本発明の態様をさらに充分に説明するだけのものであり、本発明の範囲をいかなる点でも制限するものと考えられるべきではない。

本明細書中で用いた略語には、以下の略語が含まれている：ABTS、2, 2'-アジノビス (3-エチルベンズチアゾリン スルホン酸)；Ahx、6-アミノヘキサノイル；Ala、アラニン；BAPNA、N-α-ベンゾイル-D-L-アルギニン、p-ニトロアニリド；Boc、ブチルオキシカルボニル；CBZ、カルボベンゾキシ；Cha、シクロヘキシルアラニン；DMF、N, N-ジメチルホルムアミド；E-64、L-3-カルボキシ-2, 3-トランス-エポキシ-プロピオニルロイシルアミド- (4-グアニジノ) ブタン；EDC、N-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩；EDTAエチレンジアミンテトラ酢酸 (ジナトリウム塩)；Gly、グリシン；Leu、ロイシン；Mo、メトキシイミン；OBZ、オキシベンジル；Ox、オキシム；Phe、フェニルアラニン；Sc、セミカルバゾン；THF、テトラヒドロフラン；およびTyr、チロシン。

Bio-Rad、Chelex、Chymodiactin、CH-Sepharose 4B、Chymofast、Disken、ECH-Sepharose、Bnzfitter、FPLC、Gel Bond、Mono S HR、S-Sepha-

有機上層を分離し、(イ) 水 (200 ml)、(ロ) KHCO<sub>3</sub> 水溶液 (5%、200 ml)、(ハ) HCl 水溶液 (0.5 N、200 ml)、および(ニ) 水 (3×200 ml) で順次洗浄した。温度を30℃以下に保ちながら真空下で回転蒸発により溶媒を除き、N-t-Boc-L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 b

N-t-Boc-L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメート (29 g) とトリフルオロ酢酸 (8 ml) とを一緒に室温で4時間かきまぜた。次に、温度を30℃以下に保ちながら、真空下で回転蒸発により過剰のトリフルオロ酢酸を除去した。その残留物へジエチルエーテル (30 ml) を加えて溶液とし、次にエーテルを真空下で除いた。このエーテル処理を結晶化が起るまで繰り返した。固体を濾集し、エーテルで洗浄し、次にP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してL-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩を得た。

#### 段階 c

A) L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩 (7.15 g) を室温でかきまぜながら乾燥DMF (30 ml) に溶かした。温度を30℃以下に保ちつつ、N-メチルモルホリン (23.5 g) を5分間にわたり加え、得られた混合物を0℃に冷却した。

B) CBZ-L-Ala (4.96 g) を乾燥THF (55 ml) にかきまぜながら溶かし、混合物を-10℃に冷却

した。イソブチルクロロホルメート (3.05 g) を -10℃で5分間にわたり加え、N-メチルモルホリン (2.35 g) を10分間にわたり加え、反応混合物を -10℃で更に10分間かきまぜた。

C) 溶液Aを溶液Bへ-10℃で15分間にわたり加え、次に混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを3時間続けた。混合物を0℃に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン (2.27 g) を5分間にわたり加え、かきまぜを更に5分間続けた。次に水 (50 ml) と酢酸エチル (50 ml) を加え、上層の有機相を分離し、(イ) 水 (50 ml) および飽和NaCl水溶液 (5 ml)、(ロ)  $\text{KHCO}_3$  水溶液 (5%, 50 ml) (ハ)  $\text{HCl}$  水溶液 (0.5 N, 50 ml) および(ニ) 水 (3×50 ml) で順次洗浄した。温度を30℃以下に保ちつつ、真空下で回転蒸発により溶媒を除いた。新たに酢酸エチル (50 ml) を加え、次に蒸発により除いてCBZ-L-Ala-L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 d

CBZ-L-Ala-L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメート (27.8 g) を乾燥THF (280 ml) に溶かし、 $\text{N}_2$ 下で-70℃に冷却した。THF中水素化ジイソブチルアルミニウム (1 M, 372 ml) を $\text{N}_2$ 下-70℃で60分間にわたり加え、かきまぜを-70℃で更に60分続けた。 $\text{N}_2$ 下0℃でかきまぜながら、飽和NaCl水溶液 (400 ml) およびロッシェル塩溶液 (600 ml)

ル (90 ml) に溶かし、不溶物を濾別した。CBZ-L-Ala-L-Phe Scメタノール溶液を入れた装置を $\text{N}_2$ で掃気し、触媒 (炭末上10%パラジウム) (100 mg) を加えた。閉じた系へ $\text{H}_2$ を75分間通した。触媒を濾別し、温度を30℃以下に保ちつつ真空下で回転蒸発によりメタノールを除いた。放置すると残留物は結晶化した。この固体を $\text{P}_2\text{O}_5$ 上で真空乾燥してL-アラニル-L-フェニルアラニル セミカルバゾン (L-Ala-L-Phe Sc) を得た。

#### 例 2

L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニルセミカルバゾン

#### 段階 a および b

例1の段階aおよびbに従いL-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩をつくった。

#### 段階 c

A) L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩 (1.932 g) を乾燥DMF (8 ml) に室温でかきまぜながら溶かした。温度を30℃以下に保ちながらN-メチルモルホリン (0.606 g) を5分間にわたり加え、得られた混合物を0℃に冷却した。

B) CBZ-L-Phe (1.794 g) を乾燥THF (15 ml) 中にかきまぜながら溶かし、混合物を-10℃に冷却した。イソブチルクロロホルメート (0.822 g) を-10℃で5分間にわたり加え、N-メチルモルホリン

中に加えて反応を失活させ、次に混合物を室温まで温めた。酢酸エチル (600 ml) を加え、混合物を濾過し、水層を分離し、酢酸エチル (200 ml) で抽出した。合わせた有機相を水 (600 ml) / 飽和NaCl水溶液 (400 ml) (×3) で洗浄した。温度を30℃以下に保ちつつ溶媒を真空下で回転蒸発により除いた。残留物をトルエンから再結晶し、固体を $\text{P}_2\text{O}_5$ 上で真空乾燥してCBZ-L-Ala-L-Phe-アルデヒドを得た。

#### 段階 e

A) CBZ-L-Ala-L-Phe-アルデヒド (3 g) を工業用メタノール添加酒精 (20 ml) に溶かした。溶液を50℃に加熱し、濾過して不溶物を除去した。

B) セミカルバジドHCl (1.3g) の水 (10 ml) 溶液を水 (10 ml) 中 $\text{KHCO}_3$  (1.1 g) の溶液へ加えた。

C) 溶液Bを溶液Aに加え、得られた混合物を50℃で2時間かきまぜた。酢酸エチル (50 ml) と水 (100 ml) を加え、水層を分離し、酢酸エチルで抽出し (2×20 ml)、合わせた有機相を(イ)  $\text{KHCO}_3$  水溶液 (5%, 50 ml)、(ロ)  $\text{HCl}$  水溶液 (0.5 N, 50 ml) および(ハ) 水 / 飽和NaCl水溶液 (50 ml / 20 ml × 3) で順次洗浄した。温度を30℃以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により溶媒を除去してCBZ-L-Ala-L-Phe Scを得た。

#### 段階 f

CBZ-L-Ala-L-Phe Sc (680 mg) をメタノール

(0.606 g) を10分間にわたり加え、反応混合物を-10℃で更に10分間かきまぜた。

C) 溶液Aを溶液Bに-10℃で15分間にわたり加え、次に混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを3時間続けた。混合物を0℃に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン (0.612 g) を5分間にわたり加え、かきまぜを更に5分続けた。次に水 (20 ml) と酢酸エチル (30 ml) を加え、有機相を分離し、(イ)  $\text{KHCO}_3$  水溶液 (5%, 20 ml)、(ロ)  $\text{HCl}$  水溶液 (0.5 N, 20 ml) および(ハ) 水 (2×30 ml) で順次洗浄した。温度を35℃以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により溶媒を除き、残留物をイソプロピルアルコールから再結晶してCBZ-L-Phe-L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 d

CBZ-L-Phe-L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメート (4.89 g) を乾燥THF (40 ml) に溶かした。乾いたフラスコに水素化アルミニウムリチウム (0.493 g) を入れ、乾燥THF (20 ml) を $\text{N}_2$ 下で加え、室温で10分かきまぜた後-50℃に冷却した。次に乾燥THF中ヒドロキサメートの溶液を $\text{N}_2$ 下-50℃で10分間にわたり加え、かきまぜを0~5℃で更に20分続けた。

反応混合物を-50℃に冷却し、飽和ロッシェル塩溶液 (60 ml) を $\text{N}_2$ 下で加えた。混合物を室温まで温め、

濃HCl(10 ml)を加えて水相をpH3とし、不溶物を濾別した。酢酸エチルを加え、有機相を分離し、(イ)水(50 ml)、(ロ)KHCO<sub>3</sub>水溶液(5%, 50 ml)、(ハ)HCl水溶液(0.5 N, 50 ml)および(ニ)水(3×50 ml)で順次洗浄した。次に温度を30℃以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により酢酸エチルを除いた。残留物を一晩放置し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥し、最後にトルエンから結晶化させることによりCBZ-L-Phe-L-Pheアルデヒドを得た。

#### 段階 e

- A) CBZ-L-Phe-L-Pheアルデヒド(0.645 g)を工業用メタノール添加酒精(10 ml)に70℃で溶かした。
- B) 酢酸ナトリウム三水和物(0.224 g)をセミカルバジドHCl(0.183 g)の水(3 ml)溶液に加え、工業用メタノール添加酒精(2 ml)を加え、混合物を60℃に温めた。
- C) 溶液Aを溶液Bに加え、Aを含むフラスコを更に工業用メタノール添加酒精(3 ml)で洗浄し、この洗液を混合物に加え、これを60~70℃で30分かきまぜた。混合物をゆっくり1時間放冷し、氷上に更に1時間放置し、最後に4℃で一晩放置した。固体を濾集し、工業用メタノール添加酒精:水(4:1, 3 ml)で洗浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してCBZ-L-Phe-L-Phe Scを得た。

で1/2時間加熱し、次に室温で2時間放冷した。固体を濾集し、工業用メタノール添加酒精:水(1:1, 6 ml)で洗浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してCBZ-L-Phe-L-Phe-メトキシイミンを得た。

#### 段階 f

CBZ-L-Phe-L-Phe-メトキシイミン(550 mg)をメタノール(300 ml)に溶かし、不溶物を濾別した。このメタノール性メトキシイミンを含む装置をN<sub>2</sub>で掃気し、次に触媒(炭末上10%パラジウム)(100 ml)を加えた。封じた容器にH<sub>2</sub>を通し、4 1/2時間必要に応じ再導入した。触媒を濾別し、温度を30℃以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により溶媒を除去しL-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル-メトキシイミン(L-Phe-L-Phe Mo)を得た。

#### 例 4

#### L-フェニルアラニル-D-フェニルアラニルセミカルバゾン

#### 段階 a

- A) O, N-ジメチルヒドロキシルアミンHCl(3.891 g)を乾燥DMF(40 ml)に室温で懸濁させた。温度を30℃以下に保ちながらN-メチルモルホリン(4.032 g)を5分間にわたり加え、次に混合物をかきまぜながら0℃まで冷却した。
- B) N-t-Boc-D-Phe(10.08 g)を乾燥THF(80 ml)に溶かし、-10℃に冷却した。温度

#### 段階 f

CBZ-L-Phe-L-Phe Sc(2.1 g)をメタノール(315 ml)に30℃で溶かし、不溶物を濾別した。セミカルバゾンのメタノール溶液を入れた装置をN<sub>2</sub>で掃気し、触媒(炭末上10%パラジウム)(0.35 g)を加え、閉じた系中にH<sub>2</sub>を30分通した。触媒を濾別し、温度を30℃以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により溶媒を除いた。残留物をP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥しL-フェニルアラニル-L-フェニルアラニルセミカルバゾン(L-Phe-L-Phe Sc)を得た。

#### 例 3

#### L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニルメトキシイミン

#### 段階 a~d

CBZ-L-Phe-L-Pheアルデヒドを例2の段階a~d記載のようにしてつくった。

#### 段階 e

- A) CBZ-L-Phe-L-Pheアルデヒド(0.645 g)を工業用メタノール添加酒精(35 ml)に60~65℃で溶かし、不溶物を濾別した。
- B) 酢酸ナトリウム三水和物(0.224 g)をメトキシルアミンHCl(0.138 g)の水(25 ml)溶液に60℃で加えた。
- C) 溶液Bを溶液Aに加え、Bを含むフラスコを60℃の水(10 ml)で洗い、洗液を混合物と合わせ、60°

を-10℃に保ちつつこの溶液にイソブチルクロロホルメート(5.47 g)を5分間にわたり加えた。温度を-10℃に保ちつつN-メチルモルホリン(4.032 g)を10分間にわたり加え、かきまぜを更に10分間続けた。

C) 懸濁液Aを懸濁液Bに-10℃で15分間にわたり加え、混合物を室温まで温め、3時間かきまぜた。次に、混合物を0℃に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン(3.88 g)を5分間にわたり加え、かきまぜを更に5分間続けた。水(60 ml)と酢酸エチル(60 ml)を加え、有機層を分離し、(イ)水(60 ml)、(ロ)KHCO<sub>3</sub>水溶液(5%, 60 ml)、(ハ)HCl水溶液(0.5 M, 60 ml)および(ニ)水(3×60 ml)で順次洗浄した。温度を30℃以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により溶媒を除き、N-t-Boc-D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 b

N-t-Boc-D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメート(11.3 g)を氷で冷却し、トリフルオロ酢酸(30 ml)を加え、混合物を室温で3時間かきまぜた。温度を30℃以下に保って真空下で回転蒸発により過剰のトリフルオロ酢酸を除き、残留物へジエチルエーテル(100 ml)を加えて溶液とする。溶媒を真空下で除き、結晶化が起こるまでこの方法を繰り返した。固体を濾集し、ジエチルエーテルで洗浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥

してD-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩を得た。

#### 段階 c

A) D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩(10.1 g)を乾燥DMF(41 ml)中に室温でかきまぜながら溶かした。温度を30℃以下に保ちつつ5分間にわたりN-メチルモルホリン(3.155 g)を加え、得られた混合物を0℃に冷却した。

B) CBZ-L-Phe(9.4 g)を乾燥THF(80 ml)にかきまぜながら溶かし、混合物を-10℃に冷却した。イソブチルクロホルメート(4.307 g)を-10℃で5分間にわたり加え、N-メチルモルホリン(3.155 g)を10分間にわたり加え、反応混合物を-10℃で更に10分間かきまぜた。

C) 溶液Aを溶液Bに-10℃で15分間にわたり加え、次に混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを3時間続けた。混合物を0℃に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン(3.20 g)を5分間にわたり加え、かきまぜを更に5分間続けた。次に水(60 ml)と酢酸エチル(60 ml)を加え、有機相を分離し、(イ)水(60 ml)および飽和NaCl水溶液(60 ml)、(ロ)KHCO<sub>3</sub>水溶液(5%, 60 ml)、(ハ)HCl水溶液(0.5 N, 60 ml)および(ニ)水(3×60 ml)で順次洗浄した。温度を30℃以下に保って真空中で回転蒸

を工業用メタノール添加酒精(10 ml)に60℃で溶かした。

B) 60℃の水(3 ml)中酢酸ナトリウム三水和物(0.298 g)をセミカルバジドHCl(0.244 g)の60℃における水(3 ml)溶液に加えた。

C) 溶液A, Bを合わせ、得られた混合物を60℃で5時間かきまぜた後4℃で一晩放置した。固体を濾集し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してCBZ-L-Phe-D-Phe Scを得た。

#### 段階 f

CBZ-L-Phe-D-Phe Sc(600 mg)をメタノール(90 ml)に溶かし、不溶物を濾別した。メタノール性セミカルバゾン溶液を入れた装置をN<sub>2</sub>で掃気し、触媒(炭末上10%パラジウム)(100 mg)を加えた。閉じた容器にH<sub>2</sub>を2時間通じた。触媒を濾別し、温度を30℃以下に保ちつつ真空中で回転蒸発によりメタノールを除き、L-フェニルアラニル-D-フェニルアラニルセミカルバゾン(L-Phe-D-Phe Sc)を得た。

#### 例 5

L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル オキシム

#### 段階 a~d

例2の段階 a~d記載のようにしてCBZ-L-Phe-L-Phe アルデヒドをつくった。

#### 段階 e

発により溶媒を除いた。新しい酢酸エチルを加え、次に蒸発により除いた。残留物をイソプロパノールから再結晶することによりCBZ-L-Phe-D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 d

ジクロロメタン中水素化ジイソブチルアルミニウム(1 M, 10 ml)をN<sub>2</sub>掃気したフラスコに加えた。すべてのジクロロメタンが蒸発してしまうまでフラスコを50℃に加温し、系を再びN<sub>2</sub>で掃気した。乾燥THF(10 ml)を加え、混合物を-70℃に冷却した。CBZ-L-Phe-D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメート(0.978 g)を乾燥THF(10 ml)に溶かし、水素化ジイソブチルアルミニウム溶液へ-70℃で10分間にわたり加え、かきまぜを-70℃で更に10分間続けた。反応混合物をメタノール(30 ml)および飽和ロッシェル塩溶液(30 ml)中-60℃で失活させ、混合物を室温まで温めた。水(50 ml)と酢酸エチル(50 ml)を加え、有機相を分離し、水相を酢酸エチル(50 ml)で抽出した。合わせた有機相を水(2×200 ml)洗い、濾過した。有機相を分離し、温度を30℃以下に保ちつつ真空中で回転蒸発により溶媒を除いた。新しい酢酸エチルを加え、次に除去してCBZ-L-Phe-D-Phe アルデヒドを得た。

#### 段階 e

A) CBZ-L-Phe-D-Phe アルデヒド(400 mg)

A) 上記のようにしてつくられたCBZ-L-Phe-L-Phe アルデヒド(0.645 g)を工業用メタノール添加酒精(35 ml)に60~65℃で溶かし、溶液を濾過して不溶物を除いた。

B) 酢酸ナトリウム三水和物(0.224 g)を60℃の水(25 ml)中ヒドロキシルアミンHCl(0.114 g)の溶液へ加えた。

C) 溶液Bを溶液Aに加え、Bを含むフラスコを水(10 ml)で洗浄し、洗液を混合物へ加え、次にこれを60~65℃で<sup>3</sup>/<sub>4</sub>時間かきまぜてから4℃で2~3時間冷却した。固体を濾別し、工業用メタノール添加酒精/水(1:1, 5 ml)で洗浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してCBZ-L-Phe-L-Phe Oxをsyn-およびanti-異性体の混合物として得た。

#### 段階 f

CBZ-L-Phe-L-Phe Ox(500 ml)をメタノール(130 ml)に溶かし、不溶物を濾別した。このメタノール性オキシムを入れた装置をN<sub>2</sub>で掃気し、触媒(炭末上10%パラジウム)(83 mg)を加えた。この封じた容器に次にH<sub>2</sub>を30分導入した。触媒を濾別し、温度を30℃以下に保ちつつ真空中で回転蒸発により溶媒を除いた。高真空ポンプを用いて更に溶媒を除去し、残留物をP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してL-フェニルアラニル-L-フェニルアラニルオキシム(L-Phe-L-Phe Ox)を得た。



## 例 6

L-アラニル-D-フェニルアラニル セミカルバゾン

## 段階 a および b

例 4 の段階 a および b に従い D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩をつくった。

## 段階 c

A) D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩 (5.000 g) を乾燥 THF (20 ml) に溶かし、温度を 30℃ 以下に保ちつつ N-メチルモルホリン (1.578 g) をゆっくり加え、得られた混合物を 0℃ に冷却した。

B) CBZ-L-Ala (3.463 g) を乾燥 THF (40 ml) にかきまぜながら溶かし、混合物を -10℃ に冷却した。イソブチルクロロホルメート (2.158 g) を 5 分間にわたり -10℃ で加え、N-メチルモルホリン (1.578 g) を 10 分間にわたり加え、反応混合物を -10℃ で更に 10 分間かきまぜた。

C) 二つの溶液 A と B を -10℃ で 10 分間にわたって混合し、次に混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを 3 時間続けた。混合物を 0℃ に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン (1.585 g) を加え、水 (50 ml) で反応を失活させた。酢酸エチル (50 ml) を加え、有機相を分離し、水層を酢酸エチル (2×30 ml) で抽出した。有機相を合わせ、(イ) 水 (50 ml) および飽和 NaCl 水溶液 (10 ml)、(ロ) KHC<sub>3</sub> 水溶液

(20 ml) に溶かし、50℃ に加熱した。

B) セミカルバジド HCl (1.8 g) の熱水 (15 ml) 中の溶液を水 (15 ml) 中 KHC<sub>3</sub> (1.5 g) の熱溶液へ加えた。

C) 溶液 B を溶液 A に加え、得られた混合物を 50℃ で 4 時間かきまぜた。温度を 30℃ 以下に保ちつつ真空中で回転蒸発により溶媒を除去した。残留物へ水 (50 ml) を加え、固体を濾集し、水:工業用メタノール添加酒精 (1:1) で洗浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で真空乾燥することにより CBZ-L-Ala-D-Phe Sc を得た。

## 段階 f

CBZ-L-Ala-D-Phe Sc (750 mg) をメタノール (50 ml) に溶かし、不溶物を濾別した。このメタノール溶液を入れた装置を N<sub>2</sub> で掃気し、触媒 (炭末上 10% パラジウム) (100 mg) を加えた。閉じた系中に H<sub>2</sub> を 90 分通じた。触媒を濾別し、温度を 30℃ 以下に保ちつつ真空中で回転蒸発により溶媒を除き、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で真空乾燥することにより L-アラニル-D-フェニルアラニルセミカルバゾン (L-Ala-D-Phe Sc) を得た。

## 例 7

L-チロシニル-L-フェニルアラニルセミカルバゾン

## 段階 a および b

例 4 の段階 a および b に従い L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩をつくった。

## 段階 c

(5%, 50 ml)、(ハ) HCl 水溶液 (0.5 N, 50 ml) および (ニ) 水 (3×50 ml) で順次洗浄した。温度を 30℃ 以下に保って真空中で回転蒸発により溶媒を除いた。固体を酢酸エチルから再結晶して CBZ-L-Ala-D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

## 段階 d

CBZ-L-Ala-D-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメート (2.9 g) を乾燥 THF (25 ml) に溶かし、溶液を窒素下で -70℃ に冷却した。THF 中水素化ジイソブチルアルミニウム (1 M, 37 ml) を -70℃ で 10 分間にわたり加え、かきまぜを更に 10 分間続けた。

N<sub>2</sub> 掃気の下で -30℃ においてかきまぜながら飽和ロジッセル塩溶液 (125 ml) および THF (125 ml) 中に加えて反応を失活させ、次に混合物を室温まで温めた。酢酸エチル (100 ml) を加え、有機相を分離した。水層を酢酸エチル (2×30 ml) で抽出し、有機相を合わせて水 (3×100 ml) 洗した。反応混合物を濾過し、温度を 30℃ 以下に保ちつつ真空中で回転蒸発により溶媒を除いた。新しい酢酸エチルを加え、次に除去して CBZ-L-Ala-D-Phe アルデヒドを得た。

## 段階 e

A) CBZ-L-Ala-D-Phe アルデヒド (1.2 g) を THF (20 ml) および工業用メタノール添加酒精

A) L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩 (7.95 g) を乾燥 DMF (30 ml) 中に室温でかきまぜながら溶かした。温度を 30℃ 以下に保ちつつ N-メチルモルホリン (2.49 g) を 5 分間にわたり加え、得られた混合物を 0℃ に冷却した。

B) CBZ-OBZ-L-Tyr (10 g) を乾燥 DMF (60 ml) 中にかきまぜながら溶かし、混合物を -10℃ に冷却した。イソブチルクロロホルメート (3.39 g) を -10℃ で 5 分間にわたり加えた。N-ジメチルモルホリン (2.49 g) を 10 分間にわたり加え、反応混合物を -10℃ で更に 10 分間かきまぜた。

C) 溶液 A を溶液 B に -10℃ で 15 分間にわたり加え、次に混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを 3 時間続けた。混合物を 0℃ に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン (2.52 g) を 5 分間にわたり加えた。次に水 (50 ml) と酢酸エチル (50 ml) を加え、上層の有機相を分離し、(イ) 水 (50 ml)、(ロ) KHC<sub>3</sub> 水溶液 (5%, 50 ml)、(ハ) HCl 水溶液 (0.5 M, 50 ml) および (ニ) 水 (3×50 ml) で順次洗浄した。温度を 30℃ 以下に保ちつつ真空中で回転蒸発により溶媒を除き、残留物をイソプロピルアルコールから再結晶し CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

## 段階 d

CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe-O, N-ジメチル

ヒドロキサメート (1.012 g) を乾燥 THF (10 ml) に溶かし、THF 中水素化ジイソブチルアルミニウム (1 M、8.5 ml) を -70 °C において N<sub>2</sub> 下に 10 分間にわたり加え、かきまぜを更に 10 分間続けた。N<sub>2</sub> 下 -60 °C においてかきまぜながらメタノール (20 ml) およびロッシェル塩溶液 (30 ml) 中に加えて反応を失活させ、次に混合物を室温まで温めた。水 (50 ml) と酢酸エチル (50 ml) とを加え、有機相を分離し、水 (200 ml) 洗した。反応混合物を濾過し、温度を 30 °C 以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により濾液から溶媒を除去した。次に新しい酢酸エチルを加え、回転蒸発により除いた。得られた固体を P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で真空乾燥し CBZ - OBZ - L - Tyr - L - Phe アルデヒドを得た。

#### 段階 e

A) CBZ - OBZ - L - Tyr - L - Phe アルデヒド (400 mg) を工業用メタノール添加酒精 (20 ml) と THF (10 ml) に溶かし、60 °C に加熱した。  
 B) 水 (5 ml) 中セミカルバジド HCl (600 mg) の熱溶液を水 (5 ml) 中 KHC0<sub>3</sub> (500 mg) の熱溶液へ加えた。  
 C) 溶液 B を溶液 A に加え、得られた混合物を 60 °C で 2 時間かきまぜた。温度を 30 °C 以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により溶媒を除き、残留物を水で処理した。固体を濾集し、水および工業用メタノール添加酒精で洗浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で真空乾燥して CBZ - OBZ - L - Tyr -

た。

C) 懸濁液 A を懸濁液 B へ -10 °C で 15 分間にわたり加え、次に混合物を室温まで温め、4 時間かきまぜた。混合物を 0 °C に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン (8.6 g) を 5 分間にわたり加え、かきまぜを更に 5 分間続けた。水 (200 ml) と酢酸エチル (100 ml) を加え、水層を分離し酢酸エチル (2 × 100 ml) で抽出した。合わせた有機相を (イ) 水 (100 ml) および飽和 NaCl 水溶液 (20 ml)、(ロ) KHC0<sub>3</sub> 水溶液 (5%、100 ml)、(ハ) HCl 水溶液 (0.5 N、100 ml)、および (ニ) 水 (3 × 100 ml) で順次洗浄した。温度を 30 °C 以下に保ちつつ真空下で回転蒸発により溶媒を除去し N - t - Boc - L - Cha - O、N - ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 b

N - t - Boc - L - Cha - O、N - ジメチルヒドロキサメート (26 g) およびトリフルオロ酢酸 (65 ml) を 0 °C で 5 分間かきまぜ、次に混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを 3 時間続けた。次に温度を 30 °C 以下に保ちつつ過剰のトリフルオロ酢酸を真空下で回転蒸発により除去した。残留物へジエチルエーテルを加えて溶液とし、次にエーテルを真空下で除いた。このエーテル処理を繰り返し L - Cha - O、N - ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩を黄色油状物として得た。

#### 段階 c

Phe Sc を得た。

#### 段階 f

CBZ - OBZ - L - Tyr - L - phe Sc (770 mg) を乾燥 THF (70 ml) に溶かし、濾過し、次にその濾液へメタノール (20 ml) を加えた。セミカルバゾン溶液を入れた装置を N<sub>2</sub> で掃気し、触媒 (炭末上 10% パラジウム) (100 mg) を加えた。閉じた系中へ H<sub>2</sub> を数時間通じた。触媒を濾別し、溶媒を蒸発により除いて L - チロシニル - L - フェニルアラニルセミカルバゾン (L - Tyr - L - Phe Sc) を得た。

#### 例 8

#### L - アラニル - L - シクロヘキシルアラニルセミカルバゾン

#### 段階 a

A) O、N - ジメチルヒドロキシルアミン HCl (8.51 g) をかきまぜながら乾燥 DMF (75 ml) に加え、N - メチルモルホリン (8.8 g) を 5 分間にわたり温度を 30 °C 以下に保ちつつ加えた。白色沈殿を生じた混合物を 0 °C に冷却した。  
 B) N - t - Boc - L - Cha (22.5 g) を乾燥 THF (200 ml) に溶かし、-10 °C に冷却した。温度を -10 °C に保ちつつイソブチルクロロホルメート (11.94 g) を 5 分間にわたり加えた。温度を -10 °C に保ちつつ N - メチルモルホリン (8.8 g) を 10 分間にわたり添加し、かきまぜを更に 10 分間続け

A) L - Cha - O、N - ジメチルヒドロキサメートのトリフルオロ酢酸塩 (17 g) を乾燥 THF (50 ml) に溶かし、温度を 30 °C 以下に保ちつつ N - メチルモルホリン (3.95 g) を 5 分間にわたり加え、次に混合物を 0 °C に冷却した。

B) CBZ - L - Ala (9.25 g) を乾燥 THF (100 ml) にかきまぜながら溶かし、混合物を -10 °C に冷却した。イソブチルクロロホルメート (5.35 g) を -10 °C で 5 分間にわたり加え、N - メチルモルホリン (3.95 g) を 10 分間にわたり加え、反応混合物を -10 °C で更に 10 分間かきまぜた。

C) 溶液 A を溶液 B に -10 °C で 15 分間にわたり加え、混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを 3 時間続けた。混合物を 0 °C に冷却し、3-ジメチルアミノプロピルアミン (3.98 g) を 5 分間にわたり加え、かきまぜを更に 5 分間続けた。次に水 (150 ml) と酢酸エチル (150 ml) を加え、水相を分離し、酢酸エチル (2 × 75 ml) で抽出した。合せた有機相を (イ) 水 (125 ml)、(ロ) KHC0<sub>3</sub> 水溶液 (5%、125 ml) (ハ) HCl 水溶液 (0.5 N、125 ml) および (ニ) 水 (3 × 125 ml) で順次洗浄した。温度を 30 °C 以下に保ちつつ溶媒を回転蒸発により除いた。新しい酢酸エチルを加え、蒸発により除去して CBZ - L - Ala - L - Cha - O、N - ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 d

CBZ-L-Ala<sup>L</sup>-Cha-O, N-ジメチルヒドロキサ  
メート (7.22 g) を乾燥 THF (160 ml) に溶かし、  
N<sub>2</sub>下で -70 °C に冷却した。THF 中水素化ジイソブチ  
ルアルミニウム (1 M、86 ml) を -70 °C で N<sub>2</sub> 下に  
20 分間にわたり加え、かきまぜを更に 20 分続けた。

N<sub>2</sub> 下 0 °C でかきまぜながらロッシェル塩溶液 (400  
ml) 中に入れて反応を失活させ、次に混合物を室温まで  
温めた。酢酸エチル (150 ml) を加え、混合物を 5 分  
間かきまぜた。反応混合物を濾過し、有機層を分離し、  
水相を酢酸エチル (2×50 ml) で抽出した。合わせた  
有機相を水 (3×200 ml) 洗したが、このとき最後の  
洗浄には飽和 NaCl 水溶液を添加した。温度を 30 °C 以下  
に保ちつつ回転蒸発により溶媒を除き CBZ-L-Ala-  
L-Cha アルデヒドを油状物として得た。

#### 段階 e

A) CBZ-L-Ala-L-Cha アルデヒド (8 g) を工  
業用メタノール添加酒精 (50 ml) に溶かし、50 °C に  
加熱した。

B) 水 (25 ml) 中セミカルバジド HCl (3.0 g) の熱  
溶液を水 (25 ml) 中 KHC0<sub>3</sub> (2.67 g) の熱溶液へ加  
えた。

C) 溶液 B を溶液 A に加え、得られた混合物を 50 °C で  
3 時間かきまぜた。混合物を放冷し、4 °C で一晩放置し  
た。温度を 30 °C 以下に保ちつつ工業用メタノール添加  
酒精の大部分を回転蒸発により除き、残留物へ酢酸エチ

B) N-t-Boc-Leu (23.3 g) を乾燥 THF  
(220 ml) に溶かし、-10 °C に冷却した。温度を  
-10 °C に保ちながらイソブチルクロロホルメート  
(12.90 g) を 5 分間にわたり加えた。温度を  
-10 °C に保ちつつ N-メチルモルホリン (9.51 g)  
を 10 分間にわたり加え、かきまぜを更に 10 分間続けた。

C) 懸濁液 A を懸濁液 B へ -10 °C で 15 分間にわたり  
加えた。混合物を室温まで温め、3 時間かきまぜた。次  
に、混合物を 0 °C に冷却し、3-ジメチルアミノプロピ  
ルアミン (9.13 g) を 5 分間にわたり加え、かきまぜ  
を更に 5 分間続けた。酢酸エチル (110 ml) と水  
(110 ml) を加え、有機層を分離し、(イ) 水 (2×  
100 ml)、(ロ) KHC0<sub>3</sub> 水溶液 (5%、100 ml)、  
(ハ) HCl 水溶液 (0.5 N、100 ml) および (ニ) 水  
(3×100 ml) で順次洗浄した。温度を 30 °C 以下に  
保ちつつ回転蒸発により溶媒を除き、N-t-Boc-L-  
Leu-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 b

N-t-Boc-L-Leu-O, N-ジメチルヒドロキ  
サメート (23.4 g) およびトリフルオロ酢酸 (165  
ml、0 °C に冷却) を室温で 18 時間一緒にかきまぜた。  
次に温度を 30 °C 以下に保ちつつ回転蒸発により過剰の  
トリフルオロ酢酸を除去した。残留物へジエチルエーテ  
ルを加えて溶液とし、次にエーテルを真空下で除いた。

ル (50 ml) を加えた。有機相を分離し、(イ) 水  
(30 ml)、(ロ) KHC0<sub>3</sub> 水溶液 (5%、30 ml)、  
(ハ) HCl 水溶液 (0.5 N、30 ml) および (ニ) 水  
(2×50 ml) (分離を促進するために必要に応じ飽和  
NaCl 水溶液を添加) で順次洗浄した。温度を 30 °C 以下  
に保ちつつ回転蒸発により溶媒を除去し、固体をイソプ  
ロパノールおよびエーテルから再結晶し CBZ-L-Ala-  
L-L-ChaSc を得た。

#### 段階 f

CBZ-L-Ala-L-ChaSc (900 mg) をメタノ  
ール (30 ml) に溶かし、触媒 (炭末上 10% パラジウ  
ム) (100 mg) を N<sub>2</sub> 下で加えた。閉じた系に H<sub>2</sub> を 6 時  
間通し、次に触媒を濾別した。温度を 30 °C 以下に保ち  
つつ回転蒸発により溶媒を除去し、固体をエーテルで洗  
浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で真空乾燥して L-アラニル-L-シクロ  
ヘキシルアラニンセミカルバゾン (L-Ala-L-Cha  
Sc) を得た。

#### 例 9

#### L-アラニル-L-ロイシニルセミカルバゾン

#### 段階 a

A) O, N-ジメチルヒドロキシルアミン HCl (9.17  
g) を室温でかきまぜながら乾燥 DMF (110 ml) に  
加えた。N-メチルモルホリン (9.51 g) を 5 分間に  
わたり加え、この間温度を 30 °C 以下に保った。沈殿を  
生じた混合物を 0 °C に冷却した。

4 °C で結晶化が起こるまでこのエーテル処理を繰り返し  
L-Leu-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリフ  
ルオロ酢酸塩を得た。

#### 段階 c

A) L-Leu-O, N-ジメチルヒドロキサメートのトリ  
フルオロ酢酸塩 (1.8 g) を乾燥 THF (10 ml) に  
室温でかきまぜながら溶かした。混合物を 0 °C に冷却し、  
N-メチルモルホリン (0.635 g) を 5 分間にわたり  
加えた。

B) CBZ-L-Ala (1.40 g) を乾燥 THF (20 ml)  
に溶かし、-10 °C に冷却した。イソブチルクロロ  
ホルメート (0.869 g) を -10 °C で 5 分間にわたり  
加え、N-メチルモルホリン (0.635 g) を 10 分間  
にわたり加え、反応混合物を -10 °C で更に 10 分間か  
きまぜた。

C) 溶液 A を溶液 B へ -10 °C で 15 分間にわたり加え、  
次に混合物の温度を室温まで上昇させ、かきまぜを 18  
時間続けた。混合物を 0 °C に冷却し、3-ジメチルアミ  
ノプロピルアミン (0.84 g) を加え、次に反応混合物  
を水 (25 ml) および酢酸エチル (25 ml) で失活させ  
た。水相を分離し、酢酸エチル (2×25 ml) で抽出し  
た。合わせた有機相を (イ) 水 (50 ml) および飽和  
NaCl 水溶液 (分離促進のため)、(ロ) KHC0<sub>3</sub> 水溶液  
(5%、30 ml)、(ハ) HCl 水溶液 (0.5 N、30  
ml) および (ニ) 水 (3×30 ml) で順次洗浄した。温

度を30℃以下に保ちつつ溶媒を回転蒸発により除き、固体をP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥することによりCBZ-L-Ala-L-Leu-O, N-ジメチルヒドロキサメートを得た。

#### 段階 d

CBZ-L-Ala-L-Leu-O, N-ジメチルヒドロキサメート(1.9g)を乾燥THF(40ml)に溶かし、N<sub>2</sub>下で-70℃に冷却した。THF中水素化ジイソブチルアルミニウム(1M、29.5ml)をN<sub>2</sub>下-70℃において10分間にわたり加え、かきまぜを更に10分間続けた。

N<sub>2</sub>下-60℃でかきまぜながらメタノール(50ml)およびロッシェル塩溶液(50ml)中に入れて反応を失活させ、次に混合物を室温まで温めた。水(50ml)と酢酸エチル(50ml)を加え、混合物を濾過し、水層を分離し、酢酸エチル(2×50ml)で抽出した。合わせた有機相を水(3×100ml)および分離促進のための飽和NaCl水溶液で洗浄した。温度を30℃以下に保ちつつ回転蒸発により溶媒を除き、新しい酢酸エチルを加え、次に回転蒸発により除きCBZ-L-Ala-L-Leuアルデヒドを得た。

#### 段階 e

A) CBZ-L-Ala-L-Leuアルデヒド(6.7g)を工業用メタノール添加酒精(50ml)に溶かし、50℃に加熱した。

B) 水(30ml)中KHCO<sub>3</sub>(9g)の熱溶液を水(30

(EDC)を水に溶かして0.1M EDC溶液とし、このEDC溶液のpHを塩酸または固体酢酸ナトリウムの添加によりpH4.5に安定させた。例1記載のようにしてつくったL-Ala-L-PheSc(10mg)をメタノール(400μl)に溶かし、EDC水溶液0.1M、24mlと共に洗浄後のゲルに加えた。混合物を20℃で1時間おだやかにかきまぜ、必要に応じpHをpH4.5に再調節し、かきまぜを20℃で23時間続けた。次にL-グリシンを最終濃度1Mとなるように加え、かきまぜを20℃で更に3時間続けた。このアフィニティークロマトグラフィーゲルを水性メタノール(50%、60ml)、水(60ml)および適用緩衝液(60ml)で順次洗浄し、必要時まで4℃で貯蔵した。

例11～例18

#### アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの調製

例2から例9に記載のようにつくられたジペプチド誘導体の各々を、例10記載の方法と同様な仕方でゲルマトリックスに結合させることにより、それぞれ例11から例18のアフィニティークロマトグラフィーゲルを得た。

例19

#### アフィニティークロマトグラフィー

「適用」緩衝液(リン酸ナトリウム(50mM)、EDTA(1mM)、エタジオール(33%)、pH6.8)+ジチオトレイトール(2mM)またはシステイン

ml)中セミカルバジドHCl(10.8g)の熱溶液へ加えた。

C) 溶液Bを溶液Aへ加え、混合物を50℃で3時間かきまぜ、室温に一晩放置した。固体を濾別し、工業用メタノール添加酒精：水(1:1、20ml)で洗浄し、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してCBZ-L-Ala-L-LeuScを得た。

#### 段階 f

CBZ-L-Ala-L-LeuSc(950mg)をメタノール(100ml)に溶かし、不溶物を濾別した。更にメタノール(50ml)を追加し、装置をN<sub>2</sub>で掃気した。触媒(炭末上10%パラジウム)(100mg)をN<sub>2</sub>下で加え、次に閉じた系へH<sub>2</sub>を135分間通じた。触媒を濾別し、温度を30℃以下に保ちつつ回転蒸発により溶媒を除いた。固体をP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥してL-アラニール-L-ロイシニルセミカルバゾン(L-Ala-L-LeuSc)を得た。

例10

#### 活性部位指向アフィニティークロマトグラフィーマトリックス-ECH-セファロース4B-L-Ala-PheScの調製

ECH-Sepharose<sup>®</sup> 4B(湿潤重量3g)を焼結ガラスフィルター上でNaCl水溶液(0.5M、240ml)続いて水(120ml)上で洗浄した。N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

(4mM)(1.5ml)中Powell & Schofield, UKから得た噴霧乾燥ババヤラテックス(タンパク質0.03g)を、例10～例18のアフィニティークロマトグラフィーマトリックスの各々の1mlカラムに適用した。5種類の異なる溶離剤の少なくとも一つを下記のように使用した：

溶離剤A=クエン酸ナトリウム(50mM)および

EDTA(1mM)を含む水性エタジオール(33%)中ヒドロキシエチルジスルフィド(100mM)、pH4.5；溶離前にカラムを一晩平衡化。

溶離剤B=クエン酸ナトリウム(50mM)および

EDTA(1mM)を含む水性エタジオール(33%)中2, 2'-ジピリジルジスルフィド(30mM)、pH4.5；溶離前にカラムを一晩平衡化。

溶離剤C=クエン酸ナトリウム(50mM)および

EDTA(1mM)を含む水性エタジオール(33%)中メチルピリジルジスルフィド(30mM)、pH4.5；溶離前にカラムを一晩平衡化。

溶離剤D=水酸化ナトリウム(50mM)およびEDTA

(25mM)を含む水性エタジオール(33%)中メルサリル酸(10mM)、酢酸でpH4.5に調節。連続溶離。

溶離剤 E = 酢酸ナトリウム (50 mM) を含む水性エタノール (33%) 中  $\text{HgCl}_2$  (10 mM)、pH 4.5 ; 連続溶離。

標準 Mono S (pharmacia) クロマトグラフィーの後、溶離された物質の A<sub>280</sub> 痕跡量の検査により各溶離剤での溶離を評価した。結果を下記の表 1 に要約する :

表 1  
キモババインの結合と溶離

阻害剤 ペプチド	マトリックス (例番号)	A	B	C	D	E
L-Ala-L-PheSc	10	-	ND	+	+	+
L-Phe-L-PheSc	11	-	+	+	+	+
L-Phe-L-PheMo	12	-	+	ND	ND	ND
L-Phe-D-PheSc	13	-	ND	+	+	+
L-Phe-L-PheOx	14	+	+	ND	ND	ND
L-Ala-D-PheSc	15	+	ND	ND	+	ND
L-Tyr-L-PheSc	16	+	ND	ND	+	ND
L-Ala-L-ChaSc	17	+	ND	ND	ND	+
L-Ala-L-LeuSc	18	+	ND	ND	ND	+

+ キモババインが結合し、溶離される  
- キモババインが結合せずして (または) 溶離されない  
ND 測定せず

## 例 20

### キモババインの精製

(i) Powell & Scholefield, UK から得た Carica papaya のコマーシャル品等噴霧乾燥ラテックス (1 g) を、蒸留水 (5 ml) と 1 時間かきまぜ、未溶解物質を 4 °C で 9000 × g において 30 分遠心することにより除去した。ペレットを捨て、上澄の pH を 20 分間にわたり塩酸 (1 M) で pH1.8 に調節した。かきまぜを 4 °C で 60 分続け、必要に応じ pH を pH1.8 に再調節した。

(ii) 混合物を 4 °C において 9000 × g で 30 分間遠心し、ペレットを捨てた。

(iii) (イ) NaOH (5 M) を 10 分間にわたり滴加することにより上澄の pH を pH6.8 に調節した。紫-青緑色が溶液に現われることが認められた。

(ロ) 得られた紫-青緑溶液を 10 容の「適用」緩衝液 (リン酸ナトリウム (50 mM) ; EDTA (1 mM) ; エタノール (33%)、pH6.8) に対し、緩衝液を 3 回取替えて十分に透析した。透析後の液を 4000 × g で 10 分遠心し、キモババインを含むデカンテーション上澄のタンパク質含量を約 30 mg/ml に調節した。システインを 4 mM の最終濃度まで加えることによりキモババイン溶液を活性化し、0 °C で 15 分放置した。

(iv) 適用緩衝液であらかじめ平衡化した L-Ala-L-PheSc (例 10 記載のように調製) 結合 ECH-Sepharose<sup>®</sup> の 8 ml カラムに活性化したキモババイン溶

液を流速 3.6 ml/cm<sup>2</sup>/時で適用した。カラムを適用緩衝液 (2 床容)、エタノール (33%) 中クエン酸ナトリウム水溶液 (50 mM)、pH4.5 (2 床容)、および酢酸ナトリウム水溶液 (50 mM) ; EDTA (25 mM) ; エタノール (33%) 中メルサリル (10 mM)、pH4.5 (2 床容) で順次洗浄し、次に室温で 2 時間インキュベーションした。

(v) メルサリル (10 mM) を含む酢酸ナトリウム水溶液 (50 mM) (3 床容) でキモババインを溶離し、フラクション (4 ml) を集めた。溶離されたフラクションの酵素活性を前述したように BAPNA に対する比活性について検定した。

活性フラクションを集め、Na<sup>+</sup> (50 mM) ; EDTA (1 mM) ; NaN<sub>3</sub> (0.01%) の「出発」リン酸塩緩衝液 (pH7.2) および Na<sup>+</sup> (800 mM) ; EDTA (1 mM) ; NaN<sub>3</sub> (0.01%) の「制限」リン酸塩緩衝液 (pH7.2) を用いて Mono-S HR<sup>®</sup> 10/10 (Pharmacia) カラム上での陽イオン交換クロマトグラフィーにより更に精製した。溶離は 2.7 mM/ml の塩勾配、流速 2 ml/分で行なった。フラクション (4 ml) を集め、タンパク質濃度は 280 nm における吸光度を測ることにより見積り、酵素活性は BAPNA 加水分解により検定した。

キモババイン含有フラクションを集め、蒸留脱イオン水あるいは EDTA 水溶液 (1 mM) に対して十分に透析し、貯蔵のため凍結乾燥した。

## 例 2 1

## キモババインの精製-BAPNA検定結果

(i) Powell & Scholefield, UKから得た *Carica*

*papaya*の商業品等噴霧乾燥ラテックス(1g)を水(5ml)中20℃で60分間かきまぜた。不溶物質を9000×gで4℃において30分遠心することにより除去した。ペレットを捨て、上澄のpHを塩酸(1M)の20分間にわたる滴加によりpH1.8に調節した。混合物を4℃で15分かきまぜ、5分後にpHを調べ、必要に応じて調節した。

(ii) 沈殿を9000×gで4℃において30分遠心することにより除去した。

(iii) (a) 水酸化ナトリウム水溶液(5M)をかきまぜながら滴加することにより上澄をpH7.0に調節した。沈殿を4℃において9000×gで30分遠心することにより除いた。

(b) EDTA(1mM)を含むNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>水溶液(Na<sup>+</sup>50mM)、pH7.2(緩衝液A)で予備平衡化したMono S HR 10/10(Pharmacia)陽イオン交換カラムに得られた上澄を適用した。試料適用後、カラムをA<sub>2.0</sub>がゼロに戻るまで緩衝液Aで洗浄した(2ml/分)。次に、カラムに(2.7mM Na<sup>+</sup>/ml)からNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.80M Na<sup>+</sup>)までの勾配を適用し、4mlのフラクションを集めた。このフラクションをBAPNAに対する活性について検定した。大きいキ

置換する。次に流れを再開し、カラムを再び緩衝液Aで洗浄した後、前述したようにNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.80M Na<sup>+</sup>)までの勾配を適用した。BAPNAに対して活性のあるフラクションを合わせ、システイン塩基(最終濃度4mM)を加え、次にこの合わせたフラクションを0℃で15分放置した。

Chelex樹脂(Bio-Rad, UK; 0.5g)をカラムに詰め、緩衝液Aで洗浄した。キモババインを含む貯留液をこのChelexカラムに通し、次にEDTA水溶液(1mM)中に十分に透析し、凍結乾燥した。

キモババイン精製の進行を表2に要約する。

モババインピーク(免疫学的に決定)はNa<sup>+</sup>0.17~0.28Mで溶出した。この領域においてBAPNAに対し活性のあるフラクションを集め、エタノールを33%(v/v)まで加えた。後から溶出する(Na<sup>+</sup>0.47~0.59M)ババヤプロティナーゼIIIピーク中のBAPNAに対して活性をもつものを含めて他のすべてのフラクションは捨てた。

(iv) L-Ala-L-PheSc(例10記載のように調製)に結合したECH-Sepharose<sup>®</sup>のカラム(15ml床容)を、エタノール(33% v/v)中EDTA(1mM)含有NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>水溶液(Na<sup>+</sup>50mM)、pH6.8(適用緩衝液)で洗浄した(39ml/時/cm<sup>2</sup>)。キモババイン貯留液(上記)をシステイン塩基(最終濃度4mM)の添加により活性化し、0℃で15分放置した。次にこれをカラムに適用し、続いて適用緩衝液60mlを加えた。

(v) 次にHgCl<sub>2</sub>(10mM, 45ml)を含む酢酸ナトリウム(50mM)緩衝液、pH4.5を適用した。一貫して5mlずつのフラクションを集めた。これらフラクションをBAPNAに対する活性について検定した。

前記カラムによって遅れた活性ピークを含むフラクション(HgCl<sub>2</sub>含有緩衝液で溶離された)を集め、Mono Sカラムに再び適用した。カラムを緩衝液Aで洗浄し、次にシステイン塩基(4mM)を含む7床容の緩衝液Aをカラムに適用した。30分間流れを止めて水銀を酵素から

表 2  
キモババインの精製

	タンパク質 (mg)	BAPNA 活性 (単位)	BAPNA 活性 (単位mg <sup>-1</sup> )	収量 (%)	精製 (倍)
噴霧乾燥 ラテックス	441	493,712	1,120	100	1
酸処理	361	238,636	661	48	0.59
陽イオン交換 樹脂処理	58	133,748	2,306	27	2.06
ε-Trp-L-Ala -L-PheSc	27.5	112,475	4,090	23	3.65
陽イオン交換 樹脂処理	11	44,687	4,062	9	3.63
Chelex	10.5	43,301	4,124	9	3.68

示した収量はBAPNA(またはババヤプロティナーゼIII)に対する活性の収量。  
。BAPNA検定法 No. 2

## 例 2 2

## キモババインの調製—家兎でつくり出した特異的 IgG 抗体

Zucker等(1985)(上記)により記述された方法によって、例21記載のようにしてつくられた純粋なキモババインを使用前に温和にカルボキシメチル化した。フロイント完全アジュバント中カルボキシメチル化タンパク質360 $\mu$ gを筋肉内注射し、続いて2週間後不完全アジュバント中100 $\mu$ gを皮下注射することによりキモババインに対する抗血清を家兎につくり出した。この抗血清から上記のHeideおよびSchwick(1978)により記述された硫酸アンモニウム分別、続いてNaCl(0.14M)を含むリン酸ナトリウム水溶液(10mM)(pH7.3)中に透析することによりIgGをある程度精製した。

## 例 2 3

## キモババインの精製およびキモババインとPPIVの免疫学的定量

(i~iii) Powell & Scholefield, UKから得た *Carica papaya* のコマーシャル品等噴霧乾燥ラテックス(1g)を例21(i~iia)記載のように調製し、pH1.8の処理に付した。

(iv) L-Ala-L-PheSc(例10記載のように調製)に結合させたECH-Sephrose<sup>®</sup>のカラム(床容15ml)を例21(iv)記載のように洗浄した。pH1.8処

リオン(8ml)を $\Delta A_{271}$ によりモニターし、BAPNAに対する活性について検定した。

BAPNAに対する活性ピーク(これは更に $A_{271}$ のピークにより追跡した)からなるフラクションを集め、Mono S HR 10/10陽イオン交換カラムに適用し、例21(iiib)記載のように操作した。BAPNAに対して活性なフラクションを合わせた。

噴霧乾燥ラテックスおよびpH1.8処理、アフィニティークロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーから回収された物質を、前記の単純放射免疫拡散によりPPIVの存在について分析した。例22記載のように調製した家兎で産生されるキモババイン単一特異的抗体によるキモババインの定量に対し同じ方法を用いた。本明細書に記載の方法で精製されかつ単純放射免疫拡散によりPPIVとPPIIIの両方を含まないことが示されたキモババインを使用して、キモババインに対する標準曲線をつくった。結果を表3に示す。

理から得た最終の上澄を、エタジオール(33%

v/v)中にEDTA(1mM)を含む $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ( $\text{Na}^+$  50mM)水溶液(pH6.8)(適用緩衝液)中に透析し、4000 $\times$ gで10分間遠心し、上澄をジチオトレイトール(2mM, 最終濃度)の添加により20 $^\circ\text{C}$ で15分間活性化した。次にこれをアフィニティークラム(39ml/時/cm<sup>2</sup>)に適用し、続いて適用緩衝液60mlを適用した。EDTA(1mM)およびメチルピリジルスルフィド(30mM; 15ml)(Salih等, Biochem. J. (1987), 247, 181~193による記述のように合成)を含むクエン酸ナトリウム緩衝液(50mM, pH4.5)をカラムに適用した。流れを止め、ジスルフィド含有緩衝液を20 $^\circ\text{C}$ で一晩(18時間)カラムに放置した。

(v) メチルピリジルスルフィドを含む同じ緩衝液45mlを加え、続いて適用緩衝液30mlを加えて流れを再開した。一貫してフラクション(5ml)を集めた。

これらフラクションをBAPNAに対する活性について検定した。メチルピリジルスルフィド含有緩衝液中に溶離されカラムにより遅らされた活性ピークを含むフラクションを集め、エタジオール(33% v/v)中EDTA水溶液(1mM)で平衡化しておいたSephadex<sup>®</sup> LH-20(Pharmacia)のカラム(床容80ml)に適用した(40ml/時/cm<sup>2</sup>)。この緩衝液300mlを適用することによりクロマトグラフィーを続けた。各フラクシ

表 3

キモババインの精製およびキモババインとPPIVの免疫学的定量

	タンパク質 (mg)	BAPNA 比活性* (単位mg <sup>-1</sup> )	キモババイン (mg)	PPIV (全タンパク質の%)
噴霧乾燥ラテックス	468	1,000	144	18.7
酸処理	157	1,433	92	< 0.1
セファロース-L-Ala-L-PheSc	24	4,000	28	+
陽イオン交換クロマトグラフィー	15	3,533	14	+

+ = 検出されず

\* BAPNA検定法No 2

## 例 2 4

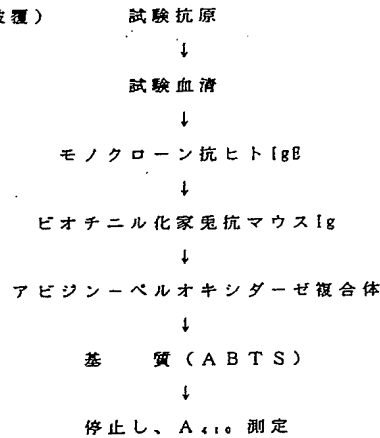
## キモババインアレルギーの研究

40本のヒト血清試料を3M Diagnostic Systems, USAから購入した。これら試料は、キモババインの市販形であるChymodiactin<sup>®</sup>に対するIgEについて、商品名Chymofastとして知られる市販試験を既に受けていた。試料のうち20本はChymofast陽性、また20本は陰性と称されていた。これら40本の試料は「めくら試験」を受け、また下に要約したビオチン-アビジン系を利用する修飾された固相酵素結合免疫吸着検定(ELISA)を用いることによりChymodiactin<sup>®</sup>、PPIII、

PPIVに対する、また精製キモバイン（本明細書中に記載の方法により精製し、単純放射免疫拡散によりPPIVおよびPPIIIの両方を含まないことが示されたもの）に対する自然に獲得したIgE抗体について更に試験した。

マイクロタイタープレート

（右記のように被覆）



Chymodiactin<sup>®</sup> はその満期日付内に使用し、PPIVは本明細書中に記載のように精製し、PPIIIはButtleおよびBarrett (1984) (前記) に従い精製した。すべての抗原は、使用に先立ち Buttle および Barrett (1984) (前記) 記載のようにヨード酢酸 (10 mM) を用いる温和なカルボキシメチル化によって不活性化した。

410 nmにおける吸光度を測定した。IgE 標準を0.075 から4.8 ng/ml (2.4 ng IgE ≡ 1 国際単位 (IU) の範囲にわたり検定した。Enzfitter プログラム (Leatherbarrow, J. R., 1985, Enzfitter for IBM PC, Elsevier-Biosoft, 68 ヒルズロード、ケンブリッジ CB2 1 LA, UK) を用いて四つの抗原調製物、Chymodiactin<sup>®</sup>、PPIII、PPIV および例2.3記載のようにして調製したキモバインの各々に対して指向したIgE の濃度を計算した。

試験した40本の血清試料中26本はChymodiactin<sup>®</sup> に対するIgE 抗体を含み、Chymodiactin<sup>®</sup> に対して最も反応性の高い12本からPPIII、PPIV およびキモバインについて得られた値を下の表4に示す。平均値および標準誤差値は9回の測定から導いた。

抗-Chymodiactin 抗体を含むこれら12本の血清試料のうち、僅か2本が主要IgE 応答を示し、PPIII およびPPIVに対する抗体が検出された関連IgE のおよそ75%を占めることが分かる。

マイクロタイタープレートの各ウェルを炭酸ナトリウム緩衝液 (0.05 M, pH9.6) 中試験抗原 (10 μg/ml) 100 μl とインキュベーションすることによりウェルを試験抗原で被覆した。次に供与馬血清 (4%) を用いて後の工程中の非特異的結合を減らした。PBS (0.1% Tween, 2% 馬血清, 10 mM の EDTA, 50 μg/ml のヘパリン; pH7.2, 100 μl/ウェル) 中試験血清 (1/20 希釈) と37℃で4時間インキュベーションし、続いてモノクローン抗-ヒトIgE (Kemny & Richards により J. Immunol. Methods (1988), 108, 105 に記述されたようにして調製、1 μg/ml) (100 μl/ウェル) と37℃で3時間インキュベーションし、次にビオチニル化した家兎抗-マウス免疫グロブリン (Dakopatts, デンマークから入手可、1 μg/ml, 100 μl/ウェル) と室温で一晩インキュベーションした。これらウェルをアビジン-ペルオキシダーゼ (10 μl/ml, 100 μl/ウェル) と37℃で30分インキュベーションし、緩衝液 (100 mM のクエン酸, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH4.2, 1 μl/ml の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で活性化) 中基質 (2, 2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸)、ABTS, 0.5 mg/ml) を加え、ウェルを室温で30分インキュベーションした。100 μl/ウェルの100 mMクエン酸、0.01% NaN<sub>3</sub> の添加により反応を停止し、各ウェルについて Micro ELISA 読取り器 (Dynatech) を用いて

表 4  
Chymodiactin<sup>®</sup> に対する IgE 抗体を含む血清試料中の比 IgE 濃度 (IU/ml)

試料	PPIV		PPIII		キモバイン		合計	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
1	19.9	1.7	18.8	1.7	8.2	1.3	46.9	18
2	5.1	0.3	4.0	0.1	3.2	0.4	12.3	26
3	5.9	0.4	2.7	0.3	1.2	0.3	9.8	12
4	1.8	0.1	2.3	0.2	1.7	0.1	5.8	23
5	3.4	0.2	2.0	0.2	1.6	0.3	7.0	23
6	3.1	0.2	0.3	0.01	0.3	0.03	3.7	8
7	2.6	0.2	1.6	0.2	0.9	0.2	5.1	18
8	2.0	0.1	1.1	0.1	1.3	0.2	4.4	30
9	1.5	0.2	0.3	0.07	1.7	0.2	3.5	43
10	1.0	0.1	0.3	0.08	0.5	0.1	1.8	28
11	3.6	0.4	1.4	0.2	0.7	0.07	5.7	12
12	0.6	0.1	0.4	0.09	2.3	0.2	3.3	70
合計	50.5		35.2		23.6		109.3	平均 22



## 例 2 5

## キモババインとPPIVの混合物のニワトリシスタチンによる阻害

キモババインを例 2 3 記載のようにして精製し、基質としてBAPNAを使用してE-64で活性部位滴定を行なうことにより標準化した(Zucher等、1985、Biochem. Biophys. Acta 828, 196-204)。前記のようにして精製したPPIVも、基質としてのアゾカゼインの使用にこの方法を適合させることによりE-64で滴定した。

ニワトリシスタチン2型は、Anastasi等、1983、Biochem. J. 211, 129-138記載のようにして精製し、前以てE-64で滴定したババインで滴定することにより標準化した。

アゾカゼイン加水分解の検定はRowan等、1988(前記)の方法により行なったが、ただし基質の添加に先立ち酵素および阻害剤の40℃、15分の前インキュベーションを取り入れた。

9本ずつの管2組を取り、4mM EDTAおよび16mMシステイン塩基を含む0.40Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)125μlを各管に入れた。キモババインおよびPPIVを、最終プロティナーゼ濃度100nMまで種々な割合で加えた。1組の管へはニワトリシスタチンを最終濃度1μMまで加え、他の組へは同体積の水を加えた。次に管を再びインキュベーションし、アゾカゼイン

の加水分解活性について検定した。

酵素混合物によるアゾカゼインの加水分解に及ぼすニワトリシスタチンの効果を、シスタチン欠如下の同じ酵素混合物により生じた活性の阻害パーセントとして表わし、表5に示す。

表 5

キモババインとPPIVの混合物のニワトリシスタチンによる阻害パーセント

PPIV (nM)	キモババイン (nM)	A-366 -シスタチン	A-366 +シスタチン	阻 害 %
100	0	0.092	0.094	0
80	20	0.158	0.102	35.4
70	30	0.191	0.088	54.0
60	40	0.316	0.06	80.0
50	50	0.347	0.058	83.3
40	60	0.428	0.066	84.5
30	70	0.543	0.028	94.8
20	80	0.588	0.033	94.4
0	100	0.733	0.008	98.9

ニワトリシスタチンによる阻害の度合はPPIV濃度と逆比例的に関連することが分かる。

## 例 2 6

## pH2.2~1.2における酸沈殿法によるキモババインの精製

i) Powell & Scholefield, UKから得たCarica papayaのコマーシャル品等噴霧乾燥ラテックスを蒸留水で20% (w/v)とし、1時間かきませた。未溶解物質を9000×gで4℃において30分遠心することにより除いた。ペレットを捨て、4℃でかきませながら塩酸

(1M)を40μl/分/mlの速度で滴加することにより上澄のpHを下げた。pH4.01およびpH1.09の標準緩衝液で目盛定めたRadiometer組合せ電極(タイプGK2401C)を使用して混合物のpHを絶えずモニターした。pH2.2において、またこれより下にpH1.2まで0.2pH単位の間隔で、酸の添加を止め、4℃でかきませを続けながらpHを一定に保った。次に、一部分(出発溶液の10mlと等価)を取り出し、貯蔵した。次のpH間隔に達するまで残りの溶液への酸添加を続けた。

ii) すべての試料を9000×gで4℃において30分遠心し、ペレットを捨てた。

iii) 各上澄のpHをNaOH(1M)の滴加(400μl/分)によりpH6.8に調節した。各試料を再び9000×gで30分間遠心して更に沈殿を除いた。

先の実験において、pH1.8での酸沈殿を25℃で行なった。

最後の上澄を各々BAPNAに対する活性について、また前記の単純放射免疫拡散により本発明に係るキモババインおよびPPIVの存在について検定した。結果を表6に示す。これら結果はpH1.8およびその下で4℃での酸沈殿により全タンパク質の<0.1%の濃度まで、またpH1.8で25℃での沈殿により<0.5%までPPIVの除去が達成されたことを示している。

表 6

条 件	温 度 (℃)	タンパク質 (mg)	BAPNA 活性 (単位×10 <sup>5</sup> )	BAPNA 比活性 (単位mg <sup>-1</sup> )	キモババイン (mg)	PPIV(全タン パク質の%)
出発溶液	-	946	15.8	1670	208	20.30
pH 2.2	4	848	9.5	1120	281	7.56
pH 2.0	4	865	9.1	1052	280	1.20
pH 1.8	4	796	8.0	1131	199	0.09
pH 1.6	4	828	7.7	930	224	0.06
pH 1.4	4	869	7.8	898	225	0.05
pH 1.2	4	784	7.1	906	166	0.03
pH 1.8	20	925	8.3	897	269	0.43

・ BAPNA 検定法 No. 2

## 例 27

## ヒツジに産生された単一特異的IgG 抗体の調製

例 21 記載のようにして調製された純粋なキモババインを、Zucker等(1985)(前記)により記述された方法により、使用前に温和にカルボキシメチル化し、NaCl(0.14 M)を含むリン酸ナトリウム水溶液(10 mM)、pH7.3中に透析した。フロイント完全アジュバント中このカルボキシメチル化タンパク質100 $\mu$ gを筋肉内注射し、続いて1ヶ月後、同じ方法で50 $\mu$ gを投与することにより、ヒツジにキモババインに対する抗血清をつくらせた。Heide およびSchwick(1978)(前出)により記述された硫酸アンモニウム分別法およびそれに続くNaCl(0.14 M)含有リン酸ナトリウム水溶液(10 mM)(pH7.3)中への透析によって該抗血清からIgGをある程度精製した。

ババイン、ババヤプロティナーゼIII およびババヤプロティナーゼIVに対する抗体のIgG 調製物を同様にしてつくった。

個々のカルボキシメチル化抗原を、製造業者の説明書に従って、NaCl(0.14 M)を含むリン酸ナトリウム水溶液(10 mM)(pH7.3)で平衡化させた商品名Zetaffinity(Anachem)として供給されるカラムに別々に結合させた。潜在的に汚染する、あるいは交差反応する抗体を、これらカラム中への通過によりIgG 調製物から吸収し去るので、その結果最終IgG 調製物はそれらのそ

ーしつつ、NaOH(1 M)を10 $\mu$ l/分/mlの速さで加えることにより上澄液のpHをpH7.0に調節した。pH7.0に達したとき、10分の時間をおいてpHを安定化させ、この時間中必要に応じpHを更に調節した。混合物を12000 $\times$ gで4 $^{\circ}$ Cにおいて30分遠心し、ペレットを捨てた。

(b) 30容の脱イオン蒸留水(12時間間隔で2回取り替えた)に対し4 $^{\circ}$ Cにおいてこの上澄を十分に透析した。

透析した溶液をS-Sepharose 高性能35/100カラム(Pharmacia)上での陽イオン交換クロマトグラフィーにより更に精製した。各実験に対し最高3gのタンパク質( $A_{280}$ により定量)を使用した。カラムをEDTA水溶液(1 mM)で4 $^{\circ}$ Cにおいて前平衡化させた。試料適用後、カラムを $A_{280}$ がゼロに戻るまで、EDTA水溶液(1 mM)を用いて10 ml/分で洗浄した。

カラムに $K^+$  0.5 Mまでの勾配( $K^+$  0.175 mM/ml)を適用し、一貫して25 mlずつフラクションを集めた。ピークフラクションをBAPNAに対する活性について検定した。

BAPNAに対し最高の比活性を有するキモババインを含むフラクション( $K^+$  0.17から0.22 Mの間で溶出)を集めた。集められたキモババインを30容の脱イオン蒸留水(12時間間隔で5回取り替えた)に対し4 $^{\circ}$ Cで十分に透析した。この透析物を凍結乾燥し、-20

れぞれの抗原とは沈殿反応を与えるが、異なる抗原とは沈殿を生ずる交差反応を起こさない。抗原と結合したカラムはジエチルアミン水溶液(0.05 M)(pH11.5)によって再使用のため再生され、すぐにリン酸塩緩衝液で再平衡化させた。

この方法でキモババイン、PPIII, PPIVおよびババインに対するIgG 抗体の単一特異的調製物がつくられ、そしてこのものは前記の単純放射免疫拡散により各抗原の定量的検定に使用することができた。

## 例 28

## キモババインの精製-pH1.5における酸沈殿

i) Siebels, U S Aから得たCarica papayaのコマーシャル品等噴霧乾燥ラテックス(20 g)を脱イオン蒸留水(4 $^{\circ}$ Cに予冷、250 ml)中0 $^{\circ}$ Cで60分かきまぜた。pH4.01および1.09の標準緩衝液(Radiometer, 25 $^{\circ}$ C)で校正したRadiometer組合せ電極(タイプGK 2401C)を用いて絶えずpHをモニターしながら、HCl C/N)を10 $\mu$ l/分/mlの速さで加えることにより、混合物のpHをpH1.5に調節した。pH1.5に達したとき、10分の時間をおいてpHを安定化させ、この時間中必要に応じpHを更に調節した。

ii) 混合物を12000 $\times$ gで4 $^{\circ}$ Cにおいて30分遠心し、ペレットを捨てた。

iii)(a) pH7.01の標準緩衝液(Radiometer, 25 $^{\circ}$ C)で校正したRadiometer電極を使用してpHを絶えずモニタ

$^{\circ}$ Cで貯蔵した。

全体の精製手順を幾つかの場合について繰り返した。本発明に係るキモババイン、ババイン、PPIII およびPPIVを前記のように単純放射免疫拡散を用いて検定し、例27記載のようにヒツジで抗体をつくった。BAPNAに対する活性およびヨード酢酸を用いた活性部位滴定を前記BAPNA方法No.1を用いて評価した。精製の進行を表7に示す平均値により要約する。

## 例 2 9

キモババインの精製—pH1.5における酸沈殿およびアフィニティークロマトグラフィー

i ~ iii) Siebels, U.S.A から得た *Carica papaya* のコマーシャル品等噴霧乾燥ラテックス (50 g) を例 2 8 (i ~ iia) 記載のように調製し、pH1.5 処理に付した。上澄を 30 容の脱イオン蒸留水 (12 時間間隔で 2 回取り替えた) に対し 4℃ で十分に透析した。

iv) L-Ala-L-PheSc (例 10 記載のように調製) に結合させた ECH-Sepharose<sup>®</sup> のカラム (床容 350 ml) を、酢酸ナトリウム (50 mM) を含むエタジオール水溶液 (33% v/v) (pH4.5) で一晚平衡化させ、次にエタジオール (33% v/v) 中に EDTA (1 mM) を含む  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液 ( $\text{Na}^+$  50 mM) (pH6.8, 適用緩衝液) で平衡化させた。

透析した上澄 (上記) を細孔寸法 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて濾過し、33% (v/v) までエタジオールを加えた。溶液の pH を調べ、必要に応じ pH7.0 に調節した。新しく調製した L-システイン水溶液 (200 mM) を 4 mM 濃度まで加え、溶液をよく混合し、4℃ で 15 分間放置した。これを次に 4℃ において 40 ml/時/cm<sup>2</sup> までの流速でアフィニティークラムに適用した。カラムを 10 床容の適用緩衝液で洗浄した。

v) 酢酸ナトリウム (50 mM) を含むエタジオール (33% v/v) 中  $\text{HgCl}_2$  水溶液 (10 mM) (pH

を 30 容の脱イオン蒸留水 (12 時間間隔で水を 5 回取り替えた) に対して 4℃ で十分に透析した。

陽イオン交換カラムから溶離されたキモババインはシステイン緩衝液によって活性化してあるので、酸化により不活性化され易かった。活性酵素の酸化による不活性化を実質的に防止または軽減するため、四チオン酸ナトリウムの懸濁液 (200 mM) を含む管にフラクションを集め各フラクション中の  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  の最終濃度を 5 mM とする。別法として、集めたキモババインを窒素下で水に対して透析した。この水は窒素下で封じた容器中で窒素を 0.1  $\ell$ /分の速度で 30 分通じることにより酸素を追い出したものである。

最後に透析物を凍結乾燥し、-20℃ で貯蔵した。

この全体的精製手順を幾つかの場合について繰り返し、精製の進行 (例 2 8 記載のようにして検定) を表 8 に示した平均値により要約する。

表 7

	全タンパク質 (mg)	BAPNA 比活性 (単位/mg)	活性部位 (%)	キモババイン (全タンパク質の%)	PPIV (全タンパク質の%)	PPIII (全タンパク質の%)	ババイン (全タンパク質の%)
出発材料	10203	572	30	25	22	14	5
pH 1.5	8168	461	28	30	0.1	14	<0.1
透析	4351	674	42	59	0.1	24	<0.1
陽イオン交換クロマトグラフィー	948	1079	72	100	0.1	<0.1	<0.1
透析	767	1098	89	100	0.1	<0.1	0.1
凍結乾燥	ND	905	ND	ND	ND	ND	ND

ND 定量せず  
全乾燥重量によりタンパク質を算定

4.5) 3 床容でキモババインを溶離し、25 ml のフラクションを集めた。BAPNA に対する活性を有するフラクションをためておき、S-Sepharose 高性能 35/100 カラム (Pharmacia) 上での陽イオン交換クロマトグラフィーにより更に精製した。

カラムを 4℃ において EDTA 水溶液 (1 mM) で前平衡化させた。試料充填後、カラムを  $\text{A}_{250}$  がゼロに戻るまで 10 ml/分で EDTA 水溶液 (1 mM) により洗浄した。EDTA (1 mM) と L-システイン (500 mM) を含む 3 床容の  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液 ( $\text{K}^+$  50 mM) (pH 7.2) をカラムに適用し、30 分流れを止めた。更に 3 床容の新しく調製したシステイン緩衝液をカラムに適用し、30 分流れを止めた。カラムを更に 6 床容のシステイン緩衝液で洗浄し、次に EDTA (1 mM) を含む  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液 ( $\text{K}^+$  50 mM) (pH7.2) で再平衡化させた。

$\text{K}^+$  0.5 M までの勾配 (0.175 mM  $\text{K}^+$ /ml) をカラムに適用し、一貫して 25 ml ずつのフラクションを集めた。ピークフラクションを BAPNA に対する活性について検定した。 $\text{K}^+$  0.2 から 0.25 M で溶離された最初のピークがキモババインであった。 $\text{K}^+$  約 0.45 M で溶離された第二のピークはババヤプロティナーゼ III であった。

BAPNA に対し最高の比活性を有するキモババインを含むフラクションを集めた。集められたキモババイン

表 8

	全タンパク質 (mg)	BAPNA 比活性 (単位 $\text{mg}^{-1}$ )	活性部位 (%)	キモババイン (全タンパク質の%)	PPIV (全タンパク質の%)	PPIII (全タンパク質の%)	パンバイン (全タンパク質の%)
出発材料	25508	572	30	25	22	14	5
pH 1.5	20421	401	28	30	<0.1	14	<0.1
透析	10877	674	42	59	<0.1	24	<0.1
陽イオン交換クロマトグラフィー	1673	1446	86	66	<0.1	13	<0.1
pH 7.0-8.0 L-Ala-L-PheSc							
陽イオン交換クロマトグラフィー	951	1625	100	100	<0.1	<0.1	<0.1
透析	828	1743	100	ND	ND	ND	ND
凍結乾燥	ND	1320 +	ND	ND	ND	ND	ND

ND 定量せず  
+ 全乾燥重量によりタンパク質を算定

表 9

	全タンパク質 (mg)	BAPNA 比活性 (単位 $\text{mg}^{-1}$ )	活性部位 (%)	キモババイン (全タンパク質の%)	PPIV (全タンパク質の%)	PPIII (全タンパク質の%)	パンバイン (全タンパク質の%)
出発材料	28795	632	31	27	25	16	6
pH 1.5	23257	458	24	28	<0.1	13	<0.1
透析	8319	916	57	75	0.2	25	<0.1
陽イオン交換クロマトグラフィー	3102	1103	72	91	<0.1	<0.2	<0.1
pH 7.0-8.0 L-Ala-L-PheSc	947	1245	89	ND	ND	ND	ND
透析	858	1587	88	100	ND	<0.1	<0.1
凍結乾燥	972	1265 +	69	ND	<0.1	ND	ND

ND 定量せず  
+ 全乾燥重量によりタンパク質を算定

## 例 3 0

キモババインの精製-pH1.5における酸沈殿およびアフィニティークロマトグラフィー

i ~ iii) Siebels, U S A から得た *Carica papaya* のコマーシャル品等噴霧乾燥ラテックスを調製し、例 2 8 記載のように pH1.5 処理、透析、および S - Sepharose<sup>®</sup> 上での陽イオン交換クロマトグラフィーにかけた。

iv) B A P N A に対し最高の比活性を有するキモババインを含むフラクションを集め、3 3 % (v/v) となるまでエタノールを加えた。新しく調製した L - システイン水溶液 (2 0 0 mM) を 4 mM の濃度になるまで加え、この溶液を例 2 9 (iv) に記載のように L - Ala - L - PheSc に結合させた E C H - Sepharose<sup>®</sup> のカラムに適用した。

v) 酢酸ナトリウム (5 0 mM) を含むエタノール (3 3 % v/v) 中 HgCl<sub>2</sub> 水溶液 (1 0 mM) (pH 4.5) 3 床容を用いてキモババインを溶出し、2 5 ml ずつフラクションを集めた。B A P N A に対し活性を有するフラクションを集め、3 0 容の脱イオン蒸留水 (1 2 時間間隔で 5 回取り替えた) に対し 4 °C で十分に透析した。透析物を凍結乾燥し、- 2 0 °C で貯蔵した。

精製の進行 (例 2 8 記載のように検定) を表 9 に要約する。

## 例 3 1

本発明に係るキモババインの二つの調製品を B A P N A 検定法 1 および 2 を用いて同じ日に検定した。タンパク質を全乾燥重量により算定した。キモババイン調製品 A は例 2 8 記載の精製手順によって得たものであり、キモババイン調製品 B は例 2 9 記載の精製手順に由来する (最終フラクションは四チオン酸ナトリウム中に集めた)。三重に実施した検定の結果を表 1 0 に示した。

表 1 0

キモババイン 調製品	B A P N A 比活性 (単位 $\text{mg}^{-1}$ )	
	検定法 No. 1	検定法 No. 2
A	855	2227
B	1261	3591

## 例 3 2

例 2 9 記載のように精製し、該例記載のように窒素下で透析したキモババインを凍結乾燥し、- 2 0 °C で貯蔵した。この凍結乾燥キモババインは 3 7 °C、pH 6.0 において B A P N A (1 mM) に対し 1 3 4 5 単位/mg の比活性を有した。

精製キモババインを含有してなる組成物のびん 1 0 0 個をつくるため、下記のように 4 3.7 5 g の溶液 (小分けする前) をつくる。この大量溶液を処理中ずっと 4 から 1 2 °C に保つ。

L - (+) システイン塩酸塩一水和物 (1 6 6 mg) を注射用の水約 3 0 g に加え、最終体積中に 2 2 mM の濃度

平成4年1月7日 通

## 特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

平成2年特許願第506580号  
PCT/EP90/00647

## 2. 発明の名称

治療剤

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
氏名(名称)

ザブーツカンパニービーエルシー

## 4. 代理人

居 所 〒100東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビルディング 331  
電話 (3211) 3651 (代表)  
氏 名 (6669) 丹理士 淺 才 啓

## 5. 補正命令の日付

## 6. 補正により増加する請求項の数

## 7. 補正の対象

明細書及び請求の範囲翻訳文

## 8. 補正の内容 別紙のとおり

明細書及び請求の範囲翻訳文の浄書 (内容に変更なし)

方式  
審 査特 許 庁  
4. 1. 8  
国際出願室

## 国際調査報告

International Application No. PCT/EP 90/00647

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (In several classification systems, symbols and/or codes)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC <sup>5</sup> : C 07 K 5/06, C 12 N 9/50, A 61 K 37/54, C 07 K 3/20		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
IPC <sup>5</sup>	C 07 K, C 12 N, A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>1)</sup>		
Category <sup>2)</sup>	Citation of Document, <sup>3)</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>4)</sup>	Relevant to Claim No. <sup>5)</sup>
X	WO, A, 8504417 (SIMMONS, J.W.) 10 October 1985 see the whole document cited in the application	1-23
X	EP, A, 0065395 (SMITH LABORATORIES) 24 November 1982 see the whole document cited in the application	1-23
A	US, A, 2313875 (EUGENE F. JANSEN) 16 March 1943 see the whole document	27
A	Biochemical Journal, vol. 250, 1988 (GB) A.L. Luaces et al.: "Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica", pages 903-909, see frontpage, abstract, page 904, "Materials and methods"	26, 28-35 -/-
<p>* Special categories of cited documents: <sup>6)</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p><sup>7)</sup> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but used to understand the principle or details underlying the invention</p> <p><sup>8)</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p><sup>9)</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p><sup>10)</sup> document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Examination of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
12th July 1990	- 3. 09. 90	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE	M. SOTELO	

Form PCT/ISA/210 (revised sheet) (January 1985)

International Application No. PCT/EP 90/00647

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category <sup>2)</sup>	Citation of Document, <sup>3)</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>4)</sup>	Relevant to Claim No. <sup>5)</sup>
A	WO, A, 8400365 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 2 February 1984 see page 16, table 1; pages 22-24, claims	33-34
A	Biochemical Journal, vol. 235, 1986 (GB) D.H. Rich et al.: "Purification of cathepsin B by a new form of affinity chromatography", pages 731-734, see the whole article	26, 28-35

Form PCT/ISA 210 (extra sheet) (January 1985)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

**V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE \***

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☒ Claim numbers 21-25, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

\* Claim no. 24-25.

See PCT Rule 39.1(iv) : Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.

2. ☐ Claim numbers ..... because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, namely:

3. ☐ Claim numbers ..... because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 8(4b).

**VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING \***

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claim(s):

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim number(s):

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remarks on Protest:

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (supplemental sheet (2)) (January 1993)

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file as of 10/08/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8504417	10-10-85	AU-A- 4217885	01-11-85
		EP-A- 0175786	02-04-86
		GB-A- 2155821	16-10-85
		JP-T- 61502444	30-10-86
EP-A- 0065395	24-11-82	US-A- 4374926	22-02-83
		US-A- 4439423	27-03-84
		AU-B- 555487	25-09-86
		AU-A- 8364182	18-11-82
		CA-A- 1183478	05-03-85
		DE-A- 3278934	29-09-88
		GB-A, B 2098997	01-12-82
		GB-A, B 2145518	27-03-85
		JP-A- 62174027	30-07-87
		CA-A- 1179263	11-12-84
		JP-A, B, C5800889	06-01-83
		US-A- 4719108	12-01-88
US-A- 2313875		None	
WO-A- 8400365	02-02-84	GB-A, B 2124233	15-02-84

EPO FORM 820

For more details about this annex, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/83

第1頁の続き

⑥Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

C 07 K 17/10  
// C 12 N 9/99

7731-4H  
7823-4B

⑦発明者 バットル, デビッド ジョン

イギリス国シービー 1 3 ビービー ケンブリッジ, ホバート ロード 5

⑦発明者 リッチ, ダニエル フルバート

アメリカ合衆国53705 ウィスコンシン州ウィスコンシン, マジソン, サミット アベニュー 1852